

信州大学審査学位論文

**生理活性タンパク質を産生する乳酸菌
組換え体の構築と応用に関する研究**

平成 29 年 3 月

重盛 駿

目次

	頁
第一章 序論	1
第二章 ヘムオキシゲナーゼ-1 を分泌する <i>Lactococcus lactis</i> 組換え体のマウス大腸炎軽減効果の検討	12
2-1 緒言	13
2-2 材料と方法	21
2-3 結果	40
2-4 考察	48
第三章 免疫活性を有する抗インターロイキン-6 抗体の single-chain variable fragment を分泌する <i>Lactococcus lactis</i> 組換え体の構築	53
3-1 緒言	54
3-2 材料と方法	58
3-3 結果	71
3-4 考察	79
第四章 ウシ β ラクトグロブリンを分泌する <i>Lactococcus lactis</i> 組換え体の構築と組換えタンパク質の生理活性の検討	81
4-1 緒言	82
4-2 材料と方法	87
4-3 結果	101
4-4 考察	108
第五章 総論	110
参考文献	117
謝辞	135
公表論文	136

第一章

序論

1-1 乳酸菌の定義と人類との関わり

乳酸菌 (lactic acid bacteria: LAB) は、消費したブドウ糖に対し 50%以上の乳酸を産生する細菌の総称であり、グラム陽性、細胞形態が桿菌もしくは球菌、カタラーゼ陰性、非孢子形成等の細菌学的特徴に定義される(1)。系統分類学的には、LAB はグラム陽性低 GC 含量細菌群である *Firmicutes* 門 (phylum) に含まれ、その内、*Bacilli* 綱 (class) *Lactobacillales* 目 (order) に分類される。*Lactobacillales* 目は 6 つの科 (family) から成り、さらに *Lactobacillus*、*Leuconostoc*、*Streptococcus*、*Ecterooccus*、*Lactococcus* 等を含む 33 の属 (genes) に分類される(1)。

LAB はヒトと深い関わりを持つ細菌である。はじめに、いくつかの LAB は消化管や生殖器といったヒトの粘膜に常在する共生細菌である。とくに、最も複雑な細菌叢を形成する大腸には、内容物 1 g 中に 10^6 - 10^8 個もの LAB が存在するといわれている(2)。粘膜常在性の LAB は、いわゆる「善玉菌」とみなされており、宿主や他の細菌との相互作用から粘膜恒常性の維持に重要な役割を担っていると考えられている(3, 4)。二つ目に、LAB は古代より発酵食品（ヨーグルトやチーズ等の発酵乳製品、漬物、発酵ソーセージ、醤油等）や発酵飼料（サイレージ）の製造に用いられ、人類に積極的に利用・摂取されてきた細菌である(1)。LAB による食飼材の乳酸発酵は、それらの保存性を高める上で有効な手段であり、加えて、好ましい風味を付加することができる。発酵食品を介した LAB 摂取の歴史は極めて古く、とくに発酵乳は紀元前数千年前より摂取されてきたと考えられている。最後に、特定の LAB はプロバイオティクスとして、ヒトや家畜の健康を維持・増進するためのツールとして利用されている(1)。プロバイオティクス (probiotics) は、抗生物質 (antibiotics) に対をなす造語であり、国際連合食糧農業機関および世界保健機関により "live microorganisms that, when administrated in adequate amounts, confer a health benefit on the host" と定義されている(5)。LAB はビフィズス菌と並びプロバイオティクスを構成する主要な細菌である。これまで、整腸作用や免疫調節作用、抗感染症作用、抗炎症作用、血圧降下作用、脂質代謝改善作用、アレルギー抑制作用、抗がん作用等、LAB は極めて多彩なプロバイオティック効果を菌株特異的に発揮することが報告されてきた(1)。近年の健康志向の高まりに加え、薬剤耐性菌の問題や予防医学的観点から、プロバイオティクスの有効利用が期待されている。歴史的な共生関係や豊富な食経験から、LAB は「地球上で最も安全な細菌」と言える。実際に、LAB に含まれる多くの細菌は、アメリカ食品医薬品局の定める Generally Recognized As Safe (GRAS) や欧州食品安全機関の定める Qualified Presumption of Safety に批准し、その安全性が担保されている。

1-2 乳酸菌の新しい利用価値：乳酸菌組換え体を用いた疾患の予防・軽減戦略

過去 30 年、LAB における遺伝子組換え技術が急速に発展し、産業的に有用な菌株を育種するための新たな手段としてその応用が検討されてきた(1)。とくに、有益な異種タンパク質を産生するよう組換えられた乳酸菌組換え体 (genetically modified LAB: gmLAB) は、それらタンパク質を生体粘膜に運搬するための“運び屋”として用いるアイディアが提唱され、疾患に対する新たな予防・軽減戦略として注目されている(1, 6-9)。

1-2-1 gmLAB における組換えタンパク質の産生

Lactococcus (L.) lactis は、代表的な乳酸球菌であり、古くよりチーズをはじめとする発酵乳製品の製造に用いられてきた GRAS 細菌である。*L. lactis* は、培養が簡単で生育が良いことや生理・遺伝学的によく特徴付けられていることなど、遺伝子組換えにおいて有用な性質を保有することから、LAB における遺伝子組換えは本菌種をモデルに研究・開発が進められてきた(10-13)。とくに、全ゲノムの解読が初期に完了した *L. lactis* subsp. *lactis* IL1403 (14)、*L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (15)およびその派生体は、組換え遺伝子の発現宿主として広く用いられている。また、これらの菌株において、外来遺伝子の導入法が検討され、グリシン処理等により細胞表層構造が脆弱になったコンピテントセルを用いる電気穿孔法が簡便で高効率な手法として確立された(16, 17)。一方で、組換え遺伝子の発現システムは多様な手法が開発され、現在では利用目的に応じて最適なシステムを選択することが可能である(11, 18, 19)。これらのシステムは、主にプラスミド DNA (遺伝子発現宿主で機能するレプリケーション遺伝子、抗生物質耐性遺伝子等のセレクションマーカーおよび組換え遺伝子の発現カセットを含む) を遺伝子発現ベクターとして用いるが、遺伝子発現カセットを染色体上に組み込む戦略も一部存在する。

gm-*L. lactis* を疾患の予防・軽減戦略として開発する場合、ある程度多量の (生理的に有意な) 組換えタンパク質を必要とするため、高コピー数のプラスミド DNA (例: *L. lactis* 由来の pWV01 や pSH71、*Enterococcus faecalis* 由来の pAMβ-1 のレプリコンを有する派生体) に強力なプロモーターに制御される遺伝子発現カセットを有するシステムが利用されてきた(19)。例えば、ナisin誘導プロモーターを用いる nisin-controlled gene expression (NICE) system (13) や pH 誘導型の P1 プロモーター(20-27)を用いるシステムは多くの研究で利用されてきた。近年、生体内のストレス (温度、胆汁酸、胃酸) で誘導される *groES* オペロンを用いた stress-inducible controlled expression (SICE) system が新しいアイディアの遺伝子発現システムとして注目されている(28)。一方で、P21、

P23、P32、P44 および P59 といった恒常発現プロモーターを用いたシステムも利用されてきた(11)。これらの中でも、NICE system は、最も頻繁に用いられる遺伝子発現システムの一つである(13, 19)。ナイシンは、いくつかの *L. lactis* が産生する食品グレードの抗菌性ペプチドである(29, 30)。*L. lactis* におけるナイシンの生合成は、11 の遺伝子から成るナイシン遺伝子クラスター (*nisABTCIPRKFE*G) に制御されており、それらの発現はナイシンにより制御される(31)。すなわち、NICE system は *L. lactis* におけるナイシン生合成の自己制御機構を利用した誘導型の遺伝子発現システムである(32)。本システムは、*nisA* の上流に存在するナイシン誘導型プロモーター P_{nisA} を目的遺伝子の上流に配置した遺伝子発現ベクターを利用する。これらのベクターを、*nisRK* オペロン (レスポンスレギュレーターである NisR およびヒスチジinkinaseである NisK をコードし、二分子制御系として外来のナイシン刺激を *nis* オペロンに伝達する) を元来有するもしくは遺伝子工学的に組込んだ宿主に導入する。得られた組換え株の培養系をナイシンで刺激することで、目的遺伝子の発現が誘導される(13, 32)。NICE system は遺伝子発現システムとして多くの利点を有する(13)。例えば、本システムは遺伝子の発現を厳密に制御することができる。また、これまで20年にも及ぶ研究の蓄積から、各種条件(培地の組成や培養条件、ナイシンの添加濃度や添加のタイミング等)が最適化され、様々な組換えタンパク質を簡便かつ高効率に産生することが可能になっている。実際に、Mierau et al は、本システムを用いて培養液 1 L あたり 300 mg もの lysostaphin (*Staphylococcus simulans* 由来の抗菌タンパク質)を得ることに成功した(33)。lysostaphin の産生効率は工業スケール (3,000 L) の培養においても同様であることが示された。さらに、同システムには豊富な遺伝子発現ツール(宿主や遺伝子発現ベクター)が存在し、*L. lactis* のみならず、他の LAB においても適応可能である。実際に、いくつかの株の *Lactobacillus* や *Streptococcus*、*Leuconostoc lactis*、*Enterococcus faecalis* における適応例が報告されている(13)。

他のグラム陽性細菌と同様に、*L. lactis* を含む LAB はタンパク質の分泌機構を有している(12)。細胞内で生成したシグナルペプチドを有するタンパク質は、細胞膜に存在する分泌装置を介して細胞外環境へと放出される。また、分泌されたタンパク質のうち、細胞膜もしくは細胞壁へのアンカーモチーフを有するものは細胞表層に繫留される。従って、gmLAB において生成した組換えタンパク質は、異なる環境(細胞内、細胞外もしくは細胞表層)に局在化させることが可能である(11, 12, 34)。組換えタンパク質を細胞外に分泌する場合、シグナルペプチド配列を目的遺伝子に融合することで達成される。同様に、細胞表層に繫留する場合、シグナルペプチド配列に加えアンカーモチーフ(例: LPXTG、lipobox、

LysM) を融合する必要がある。一方で、これらを含まない組換えタンパク質は細胞内に蓄積される。組換えタンパク質の局在は、gmLAB の利用目的に応じて選択される。gm-*L. lactis* では、シグナルペプチドは *L. lactis* に内因する Usp45 タンパク質に由来するものが、アンカーモチーフは LPXTG モチーフが多用されるが、この限りではない。gm-*L. lactis* では一般に、細胞内への蓄積に比較して細胞外への分泌の方が組換えタンパク質の収量が高いことが知られている(11, 12)。実際に、NICE system における *Staphylococcus* 由来 nuclease の産生量は、細胞内発現型の gm-*L. lactis* (3 mg/L) に比較して、細胞外分泌型の gm-*L. lactis* (20 mg/L) においておよそ 6 倍に増加した(35)。同様に、ブルセラ症の原因細菌である *Brucella abortus* 由来の抗原タンパク質(L7/L12)の産生量も、分泌により 6 倍増加したことが報告されている(36)。*L. lactis* にはいくつかのタンパク質分解酵素が内因することが知られている(37-40)。これらは、細胞内に 2 種 (ClpH、FtsH)、細胞膜に 1 種 (HtrA)、細胞外に 1 種 (PrtP) 同定されているが、このうち PrtP はプラスミド由来のため(40)、一般的に遺伝子発現宿主として用いられる plasmid-cured strain は同酵素を欠損している。これらのタンパク質分解酵素は、本来変性タンパク質を分解するなどタンパク質の品質管理ネットワークを構成しているが、遺伝子組換え株においては組換えタンパク質の分解に関与していることが示唆されている(11, 12)。実際に、*htrA* の欠損株は組換えタンパク質の産生量が増加することが報告されている(41)。すなわち、分泌を介した組換えタンパク質の産生量の増加は、これらタンパク質分解酵素からの逃避によるものと考えられている。

L. lactis における遺伝子組換え技術の発展を背景に、他の LAB においても様々な遺伝子発現システムの開発が進んできた。とくに、組換えタンパク質の粘膜運搬システムの開発では、“運び屋”として用いる LAB の生体調節機能が期待され、*Lactobacillus* 属における遺伝子発現システムが注目されている。これまで、*Lactobacillus* (*Lb.*) *plantarum*、*Lb. sakei*、*Lb. casei*、*Lb. rhamnosus*、*Lb. salivaris*、*Lb. acidophilus*、*Lb. helveticus*、*Lb. paracasei*、*Lb. jensenii*、*Lb. fermentum*、*Lb. gasseri*、*Lb. delbrueckii*等、様々な菌株において遺伝子発現システムが構築されている(18, 19)。しかし、いずれの菌株においても *L. lactis* ほど確立したシステムは存在しない。

1-2-2 粘膜ワクチンの開発

消化管や呼吸器、泌尿生殖器といった臓器は、粘膜と呼ばれる薄い膜を介して外部環境に接している。これらの臓器は、粘膜に触れる雑多な外的要因から、生体の維持に不可欠な物質(栄養や酸素)を吸収する一方で、病原物質やウイルス、

微生物の侵入を防ぐバリアとしての役割も果たしている。粘膜免疫系は、上述のような粘膜の恒常性の維持において極めて重要な役割を担うユニークな生体機構である(42)。すなわち、免疫グロブリン (Ig) A の分泌を介して病原体の中和・排除を行うと同時に、生体維持に必要な物質および微生物に対しては積極的に免疫反応を抑制する (免疫寛容)。従って、粘膜免疫系の調節は感染症やアレルギー等の予防や治療において効果的であることが考えられ、粘膜免疫系を標的とする粘膜ワクチンが注目されている(43)。従来の全身免疫系を標的とした注射型ワクチンは、粘膜免疫系を刺激することはできない。一方、粘膜ワクチンは粘膜免疫系の調節を介して全身免疫系に影響を及ぼすことが可能である。粘膜ワクチンは、口や肛門、鼻や膣を介してワクチンを粘膜面に直接作用させる必要がある。しかし、粘膜環境には、タンパク質を主成分とするワクチンを分解する様々な要因 (タンパク質分解酵素や微生物等) が大量に存在し、ワクチンを粘膜免疫系へ効率良く作用させるための運搬媒体が必要とされていた。このような背景から、gmLAB を用いた粘膜ワクチンの開発が進められてきた(8, 19)。

1-2-2-1 抗感染症ワクチン

抗感染症ワクチンは、gmLAB を用いた疾患の予防・軽減戦略の開発研究のうち、最も多くの研究がされてきた分野である(19)。感染症の原因となるウイルスや細菌、寄生虫の抗原タンパク質を産生する gmLAB が数多く構築され、実験動物を用いた研究においてその有効性が実証されてきた(7, 8, 19, 44)。これまでに発表された査読付き原著論文は 100 報以上存在する。

1990 年、Iwaki et al は *Streptococcus mutans* の表層抗原タンパク質(PAc)を細胞内に産生する gm-*L. lactis* (当時は *Streptococcus lactis* と呼ばれていた) を構築した(45)。また、同 gm-*L. lactis* のマウスへの経口投与は、PAc 特異的 IgA (唾液) および IgG (血清) の産生を顕著に誘導することを明らかにした。本研究は、gmLAB を粘膜ワクチンとして開発した最初の研究である。重要なことに、gmLAB を用いた抗原タンパク質の粘膜デリバリーは、粘膜免疫系 (抗原特異的 IgA の産生) および全身免疫系 (抗原特異的 IgG の産生) の両方を刺激できることを示した。本研究以来、様々な抗原タンパク質を産生する gmLAB が構築され粘膜ワクチンとしての有用性が検討されてきたが、その多くが抗原特異的 IgA と IgG の産生を誘導することに成功している(9)。

1993 年、Wells et al は破傷風毒素の無毒化断片 (TTFC) を産生する gm-*L. lactis* を構築した。また、同 gm-*L. lactis* のマウスへの皮下投与は致死的な毒素症を予防することを明らかにした。1997 年、2 報の論文において TTFC 産生 gm-*L. lactis* の粘膜投与は致死的な毒素症を予防することを証明し、同 gm-*L. lactis*

の粘膜ワクチンとしての利用可能性が見出された(46, 47)。以後、ワクチン効率に影響を及ぼす様々な要因（投与ルート、乳酸菌の種類、組換えタンパク質の産生量・局在、生菌・死菌の違い、粘膜アジュバント）に関して、同 gmLAB をモデルに大規模に研究が行われた(25, 46, 48-54)。これら一連の研究は、新しいアイディアの破傷風ワクチンを開発したのみならず、本戦略を用いた粘膜ワクチンの開発において検討すべき重要な要因を提起・検証したことから、本研究分野の創成期において極めて有意義な知見となった。

Hanniffy et al は、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) の抗原タンパク質を産生する gm-*L. lactis* の予防的経鼻投与は肺炎球菌の肺感染モデルおよび同敗血症モデル(いずれもマウス)における生存時間を延長することを示した(55)。重要なことに、肺感染モデルにおける PspA 産生 gm-*L. lactis* の有益性は精製 PspA を用いた粘膜ワクチンや注射型ワクチンよりも高かった。この原因は、PspA 産生 gm-*L. lactis* の投与において Th1 型の免疫応答が強く惹起ことに起因することが考察された。Mohamadzadeh et al は、樹状細胞標的化ペプチドを融合した炭疽菌防御抗原 (PA) を産生する gm-*Lb. acidophilus* の経口投与は炭疽菌感染モデルにおける致死率を軽減することを示した(56)。また、同予防効果は PA 単体を産生する gm-*Lb. acidophilus* より強く、精製 PA+水酸化アルミニウムアジュバントの注射ワクチンと同等であることを示した。上述の研究は、世界規模で問題となる致死的な感染症の新しいワクチンを提案し、gmLAB ワクチンの有効性や優位性を示したことから高く評価されている。この他にも、良く検証が行われている gmLAB ワクチンとして、ヒトパピローマウイルス誘導ガンワクチン（ごく近年臨床試験が行われ、ポジティブなデータが得られている）(28, 57-70)、*Helicobacter pylori* 感染症ワクチン(71-80)、インフルエンザワクチン(81-97)、エイズワクチン(98-102)、肺炎球菌ワクチン(103-111)等が挙げられる。

1-2-2-2 抗アレルギーワクチン

アレルギーは、特定の物質（アレルゲン）に対して過剰な免疫応答が惹起される疾患の総称で、媒介する免疫応答の違いから 5 つのクラスに分類されている。とくに、食物アレルギーや喘息、アトピー性皮膚炎に代表される IgE 媒介型の I 型アレルギーは、先進諸国を中心に患者数が増大しており問題視されている(112-114)。現在に至るまで、アレルギーに対する根本的な予防・治療法は確立していない。しかし、粘膜免疫系における免疫寛容の機能が明らかになると、同機能の誘導を目的とした抗アレルギーワクチンの考えが注目されるようになった。とくに、舌下や腸管の粘膜にアレルゲンを少量ずつ提示することで抗原特異的な

免疫寛容の誘導を目指す減感作療法は、アレルギーの根本治療法として注目されている。実際に、食物アレルギー（ピーナッツ、牛乳、鶏卵等）患者を対象とした臨床研究において本療法によるアレルギーの根治が報告された(115)。一方、本療法を用いたいくつかの臨床研究では失敗例も存在し、アナフィラキシーを始めとする重篤な副作用の問題も指摘されている(116)。実際に、1型糖尿病患者における経口インスリン療法では有益な治療効果は得られなかった(117)。このような背景から、ワクチンの効率化が強く求められており、gmLAB を用いたアレルギーの粘膜デリバリーが注目されている(118, 119)。

2007年、Huibregtse et al は鶏卵アレルギーの主要アレルギーである卵白アルブミン (OVA) を分泌する gm-*L. lactis* を構築し、同 gmLAB の抗アレルギーワクチンとしての効果を DO11.10 マウス (OVA 特異的 T 細胞受容体を発現するトランスジェニックマウス) を用いて検討した(22)。OVA 産生 gm-*L. lactis* の予防的な経口投与は、OVA の注射により誘導される遅延型過敏症の症状を軽減することを示した。また、OVA 産生 gm-*L. lactis* の経口投与は粘膜免疫系および全身免疫系の両方において OVA 特異的な免疫寛容を誘導し、同応答は CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Treg) および transforming growth factor- β に媒介されることを示した。重要なことに、治療効果を得るために必要な OVA の曝露量は、従来必要と考えられていた量 (5 mg) と比較して OVA 産生 gm-*L. lactis* 処置 (0.01 mg) ではおよそ 1/500 だった。実際に、OVA 産生 gm-*L. lactis* は精製 OVA (1 mg) の経口投与よりも遅延型過敏症の症状を著しく軽減することが示された。すなわち、gmLAB を用いたアレルギーの経口デリバリーは、従来の精製タンパク質を用いた手法と比較して少量のアレルゲン曝露で高いワクチン効果を得られることから、安全で効率的な戦略であることが示唆された。以来、抗原特異的免疫寛容の誘導を目的にアレルギーおよび/もしくはサイトカインを産生する gmLAB (主に *L. lactis*) が構築され、牛乳アレルギー(120)、鶏卵アレルギー(121)、ダニアレルギー(122)、セリアック病(21)、1型糖尿病(23, 26, 123, 124)、多発性硬化症(125)のモデルマウスを用いた研究においてその予防・軽減効果が実証されている。

I 型アレルギーはアレルギー特異的 IgE に媒介される過剰な免疫応答に特徴付けられるが、IgE の産生誘導には Th2 と呼ばれるヘルパー T 細胞サブセットが重要な役割を担っている。一方で、Th2 は Th1 と拮抗関係にあり、アレルギー特異的な Th1 型免疫応答の誘導は I 型アレルギーの症状を軽減することが知られている。いくつかの LAB は Th1 型免疫応答を誘導することが知られており、アレルギーを産生する gmLAB は同反応を効率良く誘導するための手段として期待されている(118)。実際に、Adel-Patient et al は β -ラクトグロブリン (BLG, 牛乳ア

レルゲン) を産生する gm-*L. lactis* のマウスへの経口投与は、BLG 特異的 Th1 免疫応答の誘導に伴い、BLG 特異的 IgE の産生を抑制することを明らかにした(126)。Cortes-Perez et al は、BLG 産生 gm-*L. lactis* のマウスへの経鼻投与は脾臓におけるインターフェロン (IFN) γ (代表的な Th1 サイトカイン) の産生を増強し、呼吸器局所における Th2 免疫応答 (IL-5 産生および好中球浸潤) を抑制することを示した(127)。さらに、IL-12 (代表的な Th1 サイトカイン) 産生 gm-*L. lactis* との共投与は Th1 免疫応答を増強することを明らかにした。Daniel et al は、Bet v 1 (カバノキ花粉中のアレルゲン) を分泌する gm-*L. lactis* および gm-*Lb. plantarum* のマウスへの経鼻投与は、Th1 免疫応答を誘導することで同アレルゲンへの感作を軽減することを示した(128)。近年では、Ara h 2 (ピーナツアレルゲン) を産生する gm-*L. lactis* が構築され、同 gmLAB の経口投与は粗ピーナツ抽出物感作マウスにおける特異的 Th1 免疫応答 (IgG2a および IFN- γ) を誘導し、特異的 Th2 免疫応答 (IgE および IL-4) を抑制することを明らかにされた(129)。上述以外にも、牛乳アレルゲン (BLG (130-132)、 α_{s1} -カゼイン(133))、ソバアレルゲン (Fagag1 (134))、イエチリダニアレルゲン (Der p 1 (135, 136)、Der p 5 (137))、スギ花粉アレルゲン (Cry j 1 (138)) カバノキ花粉アレルゲン (Bet v 1 (139)) を産生する gmLAB が構築され、それらの抗アレルギー効果が検討されている。

1-2-3 その他疾患への適応

gmLAB を用いた抗炎症タンパク質の腸管送達は、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases: IBD) に対する有効な予防・軽減法として注目されている(140, 141)。詳細は第二章で述べる。

病原体に対する中和抗体フラグメントを産生する gmLAB は感染症予防・軽減における利用が期待されている。Beninati et al は、*Candida albicans* (カンシダ症の原因細菌) に対する single-chain variable fragment (scFv) 抗体を産生する *Streptococcus gordonii* を作出し、同 gmLAB を用いてラットにおける実験的膣炎を治療することに成功した(142)。Kruger et al は、*Streptococcus mutants* に対する scFv 抗体を細胞壁に繫留する *Lb. zeae* を構築し、同 gmLAB の経口投与はラットにおけるう蝕を予防することを示した(143)。Pant et al は、ロタウイルスに対する中和抗体 (heavy-chain antibody fragments) を産生する *Lb. paracasei* の経口投与は、マウスにおけるロタウイルス下痢症を予防することを示した(144)。Andersen et al は、炭疽菌毒素の中和 scFv 抗体を細胞壁に繫留する *Lb. paracasei* は、マウス腸管において同毒素を中和することを示した(145)。Hoang et al は、抗ウイルス活性を有する scFv 抗体 (3D8 scFv) を

細胞壁に繫留する *Lb. paracasei* を構築し、同 gmLAB のマウスへの経口投与はノロウイルスの感染を予防することを明らかにした(146)。この他にも、ヒト免疫不全ウイルスの感染予防に有益な scFv 抗体を産生する gmLAB が報告されている(147, 148)。

上述以外にも、肥満・過食の抑制(149)、ヒト免疫不全ウイルスの感染予防(150-153)、鉛中毒の予防(154)、2 型糖尿病の軽減(155, 156)、家畜の成長促進(157-162)等において gmLAB を利用するアイデアが提唱されている。

1-2-4 研究・開発の動向

本研究分野は、LAB における遺伝子組換え技術の発展を背景にすることから、それらの研究が盛んに行われていた欧州を中心に研究が進められてきた。とくに、1990 ~ 2000 年代初頭における創成期には、主にイギリスやフランス、オランダ、ベルギーの研究グループが gmLAB を疾患の予防や治療に用いるアイデアを提唱した。以来、本分野はこれらの研究グループが牽引する形となったが、現在では南米や北米、中国の研究グループからも様々なアイデアが報告され、急速に伸展している。現時点では、遺伝子組換え生物に対する法的・倫理的規制があるため、gmLAB の疾患予防・軽減効果の検証は主に齧歯類を用いた研究にとどまっている。しかし、近年では、gmLAB の生物学的封じ込めや安全性等に関する技術の開発や知見の蓄積が進んでおり、家畜やサル、ヒトにおける臨床研究の報告もいくつか存在する（第五章参照）。従って、本戦略は未だ多くの問題を抱えているものの、これらの報告が存在することはその有用性が認知され始めている証拠であり、実用化に向けた本格的な取り組みも考えられる段階に差し掛かってきている。

予想外にも、「gmLAB を有益タンパク質の粘膜運搬媒体として用いるアイデア」を世界に先駆けて提唱・実証したのは我が国の研究グループである。1990 年、国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）のグループは、う蝕病原菌の抗原タンパク質を産生する gm-*L. lactis* の経口投与はマウスにおいて抗原特異的な粘膜および全身免疫応答を惹起することを *Infection and Immunity* 誌に発表した(45)。また、2003 年に Codex で「生きた組換え微生物の食品への利用に関するガイドライン」が承認されると、2008 年にわが国では「遺伝子組換え食品(微生物)の安全性評価基準」を制定し、遺伝子組換え微生物を食品へ応用するための基盤を世界に先駆けて整備した。しかしながら、本分野の研究は我が国においてほとんど行われていないのが現状である。これまで我が国において関連研究を行ったグループは数グループにとどまり、発表された査読付き原著論文数も少ない。この現状は、我が国の遺伝子組換え技術に対する否定的感情の根深さが大きな要

因になっていることは否定できない。しかし、世界的には「本戦略は難治性疾患を含む様々な疾患の新しい予防・治療法として有益」と考える見方が日々高まっており、我が国の現状とは大きな隔たりがあると言わざるを得ない。

1-3 研究の目的

私は、gmLAB を我が国において安心・安全に利用するための基盤が必要であり、そのための基礎的知見の蓄積が必要であると考え。そこで本研究は、"我が国発"の gmLAB の構築に取り組み、疾患の予防や軽減に向けた有用性を検討することを目的とした。具体的には以下の研究を遂行した。

1. ヘムオキシゲナーゼ-1 を分泌する gm-*L. lactis* を構築し、大腸炎モデルマウスにおける抗炎症効果を検討した（第二章）。
2. インターロイキン-6 特異的抗体を分泌する gm-*L. lactis* を構築し、組換えタンパク質の免疫活性を検討した（第三章）。
3. ウシ β ラクトグロブリンを分泌する gm-*L. lactis* を構築し、組換えタンパク質の生理活性を検討した（第四章）。

第二章

ヘムオキシゲナーゼ-1 を分泌する *Lactococcus lactis*

組換え体のマウス大腸炎軽減効果の検討

2-1 緒言

炎症性腸疾患（inflammatory bowel diseases: IBD）は、消化管（gastrointestinal tract: GIT）において発症する間欠的な慢性炎症疾患であり、その病態から主に潰瘍性大腸炎（ulcerative colitis: UC）とクローン病（Crohn's disease: CD）に分けられる。近年、欧米諸国を中心とする先進諸国において IBD の発症率や有患率が著しく増大しており、公衆衛生上、世界的な問題になりつつある(163)。我が国における IBD 有患率は、欧米諸国と比較すると低率であるものの、近年、UC および CD 共に爆発的に増大している（公益財団法人 難病医学研究財団 / 難病情報センター： <http://www.nanbyou.or.jp/entry/62>, <http://www.nanbyou.or.jp/entry/81>）。IBD 患者は、GIT における炎症性の障害から腹部の痙攣や痛み、下痢、便秘、嘔吐等の症状に長期間悩まされ、同時に発熱、食欲減退、体重減少等の症状も現れることから、生活の質（quality of life）を著しく損なうことになる(164)。現在のところ、IBD の正確な病因は明らかになっていない。しかし、これまでの研究は、遺伝、環境および微生物と言った多要因の複合が IBD の発症に関与していることを示唆している(165)。

現在、UC および CD 共に、有効な治療法はなく、予防法も存在しない。従って、疾患の寛解を導入もしくは維持するための対症療法（食事療法：経腸栄養療法または完全静脈栄養、薬物療法：後述の薬剤の注射、外科療法：手術）が一般的である。とくに、IBD における炎症は腸内環境の著しい変化（腸内細菌叢の量および組成、代謝の変化、上皮バリア機能の崩壊）に伴う免疫応答の調節不全に特徴付けられる(165)ことから、薬物療法では抗炎症薬（アミノサリチル酸、副腎皮質ステロイド）や免疫抑制薬（チオプリン、カルシニューリン阻害薬、メトトレキサート、抗 tumor necrosis factor (TNF) 製剤）が用いられる(164)。しかし、これらの薬剤を用いた全身療法は、特定の患者では十分な治療効果が得られないこと、重篤な副作用を引き起こす可能性があること、および/もしくは治療費が高額であることなど、重大な問題が存在する(164, 166, 167)。

上述の予防・治療学的背景から、IBD の新規予防・軽減戦略の一つとして、乳酸菌組換え体（genetically modified lactic acid bacteria: gmLAB）を用いた抗炎症タンパク質の経口デリバリーシステムが注目されている。すなわち、gmLAB の経口投与は、1) 予防・治療分子を腸管局所に作用させることができ、従来の注射による全身療法に比較して有効性が高く医療ミスおよび副作用のリスクが低いこと、2) 精製薬と比較して安価であることが期待されている(7, 8, 141)。実際に、これまで様々な抗炎症タンパク質を産生・分泌する gmLAB が構築され、それらの経口投与による抗炎症効果が IBD モデル動物を用いた in vivo 試験において証明されてきた（Table 2-1）。例えば、Steidler et al はインターロイキン

(IL) -10 を分泌する *Lactococcus (L.) lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (MG1363) 組換え体を構築し、同 gmLAB の経口投与は IBD モデルマウスにおける大腸炎の発症および進行を劇的に軽減することを示した(24)。Del Carmen et al は、抗酸化酵素 (catalase もしくは superoxide dismutase) を分泌する *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* CRL807 組換え体の経口投与はマウスにおける急性大腸炎を軽減することを示した(168)。加えて、LL-Thy12 (生物学的封じ込め戦略を講じた IL-10 分泌 MG1363 (169)) を用いた Phase 1 臨床試験では、CD 患者における同 gmLAB の安全性、生物学的封じ込めおよび有意な治療効果が確認された(170)。しかし、続く Phase 2a 臨床試験では、LL-Thy12 処置群とプラセボ処置群の間の治療効果に統計学的に有意な治療効果は観察されなかった (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00729872)。すなわち、同戦略は更なる有効性の改善が求められている。

ヘムオキシゲナーゼ (HO) -1 は、生体内においてヘムの分解を触媒する律速酵素であり、炎症や酸化といった種々のストレス刺激により発現が誘導される(171, 172)。生体内において、HO-1 は酸素分子と還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADPH) -シトクロム P450 還元酵素により供給される電子を用いてヘム分子を段階的に分解し、ビリベルジン、遊離鉄および一酸化炭素 (CO) を生成する(172) (Fig. 2-1)。生成したヘム分解産物は、それぞれ異なる機序を介して抗炎症・抗酸化・免疫調節作用等を発揮する(171)。すなわち、HO-1 は炎症や酸化等の障害に対する生体防御において重要な役割を担っていると考えられている。

HO-1 は、IBD モデル動物において保護効果を発揮することが報告されている。実際に、内因性 HO-1 の誘導剤やヘム分解産物 (CO、ビリベルジン) の投与は、実験的大腸炎を軽減することが報告されている(173, 174)。反対に、HO-1 阻害剤の投与は、大腸炎症状を悪化させることが報告された(175, 176)。HO-1 は様々な機序 (免疫応答の調節、抗酸化、抗アポトーシス、細菌排除の促進等) を介して抗炎症効果を媒介することが示されている(177-188)。例えば、Zhang et al は、hemin (HO-1 誘導剤) の腹腔内投与 (i.p.) は、HO-1 の活性化を誘導し、マウスにおける実験的大腸炎の症状を軽減することを示した(187)。同研究は、HO-1 が媒介する免疫調節作用を示した。Berberat et al は、HO-1 誘導剤である cobalt protoporphyrin の i.p. はマウス大腸炎を軽減することを示した(177)。また、同様の大腸炎軽減効果はビリベルジンの i.p. においても得られた。Hegazi et al は、マウスへの CO の暴露は、HO-1 経路の活性化に依存して、大腸炎症状を軽減することを示した(180)。以上の事実から、HO-1 は IBD の予防・治療標的分子として注目されている。

本研究は、gmLAB を用いて HO-1 を腸管局所に作用させることができれば、IBD を効率的かつ安全に予防・軽減できるのではないかと仮説を立てた。そこで本研究では、マウス（m）HO-1 を分泌する gm-*L. lactis*（NZ-HO）を構築し、同 gmLAB の抗炎症効果を IBD モデルとして有用なデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導急性大腸炎マウスを用いて検討することを目的とした。

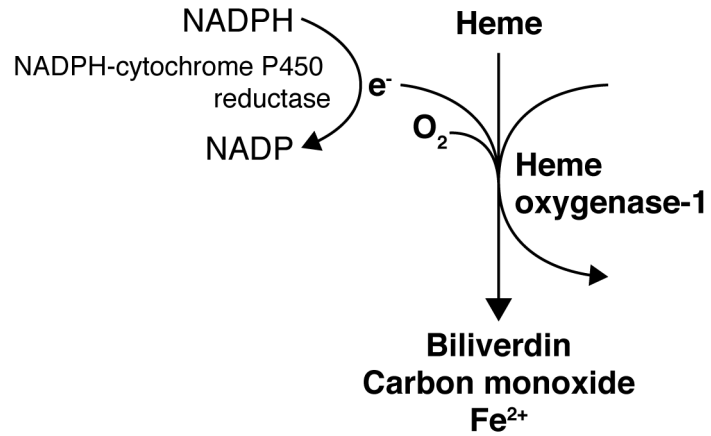


Fig. 2-1 Enzymatic reaction of HO-1. HO-1 catalyzes the heme degradation using molecular oxygen and electrons provided by NADPH-cytochrome P450 reductase, and leads to generation of biliverdin, carbon monoxide, and ferrous iron as final products.

Table 2-1 Pre-clinical evidences showing beneficial effects of gm-LAB in treatment of GIT inflammation (141).

LAB	Recombinant Protein	Disease model	Outcome	Efficacy	Potential mechanisms	Ref.
<i>Lactococcus lactis</i>						
MG1363	Anti-TNF Nanobody	mDCC, mIL-10 ^{-/-}	Reduction in HS, and IM (MPO)	CC = VC < MG1363-IL-10 = Object (mDCA) CC = Oral/Systemic anti-TNF Nanobody = VC = MG1363-IL-10 < Object (mIL-10 ^{-/-})	Neutralization of TNF	(27)
MG1363 /NZ9000	IL-10	mDAC, mTAC, mIL-10 ^{-/-}	Reduction in MS, HS, and IM (MPO, Cox-2, SAA) Modulation of P/AICy	CC = WT/VC < Objects	Immunomodulation	(24, 189-192)
MG1363	IL-27	mTTC, mDAC	Reduction in Mo, MS, and HS Modulation of P/AICy, and PTc	CC = Systemic IL-27 = VC < Object MG1363-IL-10 < Object	Immunomodulation	(20)
MG1363	LcrV	mDAC, mTAC	Reduction in MS, HS, CS, and IM (MPO, PICy, Cox-2, SAA)	CC = WT < MG1363-IL-10 = Object	Immunomodulation	(190)
MG1363	MAM	mDNAC	Reduction in MS, and IM (PICy)	VC < Object	Immunomodulation	(193)

MG1363	TSLP	mDAC	Reduction in MS, HS, and IM (PICy) Increase in Treg	WT < Object	Immunomodulation	(194)
MG1363	TTFs	mDAC, mIL-10 ^{-/-}	Reduction in Mo, MS, HS, and IM (MPO) Induction of Ptgs2 expression	CC = Oral/Rectal TTF = VC = MG1363-IL-10 < Objects	Promotion of wound healing in intestinal mucosa	(195)
NCDO 2118	15-LOX-1	mTAC	Reduction in MS, HS, LMT	CC ≤ WT ≤ Object	Reduction in oxidative stress	(196)
NZ3900	Cathelicidin	mDAC	Reduction in MS, HS, CS, Ap, FMP, and IM (MPO, PICy, MDA)	CC = VC ≤ SASP ≤ Object	Promotion of wound healing in intestinal mucosa	(197, 198)
NZ9000	Elafin/SLPI	mDAC, mDCC, mTTC, hIEC	Reduction in MS, HS, CT, IIP, and IM (PL, MPO, PICy, PIL)	CC ≤ WT < <i>L. lactis</i> IL-10/TGF-β < Objects	Reduction in elastolytic activity	(189, 199)
NZ9000	IGF-I	mDAC	Reduction in HS, CS, and IM (MPO, DAO) Increase in occludin	CC ≤ VC ≤ Object	Improvement of intestinal barrier function	(200)
NZ9800	SOD	rTAC	Reduction in MS, HS, and IM (MPO, NT)	CC < WT = Object	Reduction in oxidative stress	(201)

Lactobacillus

<i>casei</i> BL23	Cat/SOD	mDAC, mTAC	Reduction in MS, HS, and LMT Modulation of P/AICy	$CC \leq WT/VC < \text{Object}$	Reduction in oxidative stress Immunomodulation	(202- 204)
<i>casei</i> BLS	α -MSH	mDAC	Reduction in Mo, MS, HS, CS, and IM (MPO, NF- κ B) Modulation of P/AICy	$CC \leq WT < \text{Object}$	Immunomodulation	(205)
<i>casei</i> CECT 5276	IL-10	mDAC	Reduction in MS, HS, CS, and IM (NF- κ B) Modulation of P/AICy	5-ASA $\leq WT + 5\text{-ASA}$ $< \text{Object} + 5\text{-ASA}$	Immunomodulation	(206)
<i>fermentum</i> I5007	Cat	mDAC	Reduction in HS, IM (NF- κ B, MPO, LP) Increase in <i>Lb</i> and <i>Bi</i> in colon	$CC = VC < V_E = \text{Object}$	Reduction in oxidative stress	(207)
<i>fermentum</i> I5007	SOD	mTAC	Reduction in MS, HS, IM (NF- κ B, MPO, LP)	$CC \leq WT \leq \text{Object}$	Reduction in oxidative stress	(208)
<i>gasseri</i> NCK 334	SOD	mIL-10 ^{-/-}	Reduction in HS, IM (MPO, Cox-2) Modulation of Ao	$CC \leq VC \leq \text{Object}$	Reduction in oxidative stress	(209)
<i>plantarum</i> NCIMB 8826 Int-1	SOD	rTAC	Reduction in MS, HS, and IM (MPO, NT)	$CC = WT < \text{Object}$	Reduction in oxidative stress	(201)

Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus

CRL807	Cat/SOD	mTAC	Reduction in Mo, MS, HS, and LMT	CC < WT < Objects	Reduction in oxidative stress	(168)
			Modulation of CPlc		Immunomodulation	

Ref.: references, MG1363/NZ3900/NZ9000/NZ9800: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363/NZ3900/NZ9000/NZ9800, NCDO 2118: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118, TNF: tumor necrosis factor, IL-10: interleukin 10, IL-27: interleukin 27, LcrV: low calcium response V antigen from *Yersinia pseudotuberculosis*, MAM: anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, TSLP: thymic stromal lymphopoietin, TTFs: trefoil factors, 15-LOX-1: 15-lipoxygenase-1, SLPI: secretory leukocyte protease inhibitor, IGF-I: insulin-like growth factor I, SOD: superoxide dismutase, Cat: catalase, α -MSH: α -melanocyte-stimulating hormone, AvCys: cystatin from *Acanthocheilonema viteae*, mDCC: murine dextran sulfate sodium-induced chronic colitis, mIL-10^{-/-}: spontaneous colitis in IL-10 deficient mice, m/rDAC: murine/rat dextran sulfate sodium-induced acute colitis, m/rTAC: murine/rat 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced acute colitis, mTTC: murine T-cell transfer-induced enterocolitis, mDNAC: murine-dinitrobenzene sulfonic acid-induced acute colitis, hIEC, human intestinal epithelial cells, HS: histological symptoms, IM: mediators of inflammation, MPO: myeloperoxidase activity, MS: macroscopic symptoms, Cox-2: cyclooxygenase-2 activity, SAA: serum amyloid A, P/AICy: pro-/anti-inflammatory cytokines, Mo: mortality, PTC: phenotypes of T-cell, CS: colon shortening, PICy: pro-inflammatory cytokines, Treg: regulatory T-cell, Ptg2: prostaglandin-endoperoxide synthase 2, LMT: liver microbial translocation, Ap: apoptosis in colonic tissues, FMP: fecal microbiota populations, MDA: malonaldehyde activity, CT: colon thickening, IIP: intestinal epithelial permeability, PL: proteolytic activity, PIL: pro-inflammatory leukocytes, DAO: diamine oxidase activity, NT: nitrotyrosine, NF- κ B: nuclear factor- κ B, LP: lipid peroxidation, *Lb*: Lactobacilli, *Bi*: Bifidobacteria, Ao: antioxidants, CPlc: cytokine phenotypes of immune cells, CC: colitis control, VC: vector control, MG1363-IL-10: IL-10-secreting MG1363, WT: wild-type strain, SASP: sulfasalazine, NZ9000-IL-10/TGF- β : IL-10- or TGF- β -secreting NZ9000, 5-ASA: 5-aminosalicylate, V_E: vitamin E

2-2 材料と方法

2-2-1 倫理的承認

全ての遺伝子組換え実験は、「信州大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則り、機関長の承認を受けて法令・指針等の申請に基づいた制限環境下にて行った（承認番号：13-005）。全ての動物実験は、「信州大学動物実験等実施規程」に則り、機関長の承認を受けて法令・指針等の申請に基づいた制限環境下にて実施した（承認番号：260061）。

2-2-2 菌株と培養条件

組換え遺伝子の発現宿主は *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (NZ9000; VS-ELS09000-01, MoBiTec GmbH, Goettingen, Germany) を用いた。NZ9000 は 0.5% glucose (16805-35, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を含む M17 培地 (218561, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) (GM17) で培養した。必要に応じて、GM17 に chloramphenicol (08027-14, Nacalai Tesque, Inc.) (10 µg/mL) を添加した (GM17cm)。 *Escherichia* (*E.*) *coli* JM109 (9052, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) および MC1061 (VS-ELS10610-01, MoBiTec GmbH) は、Luria-Bertani (LB) 培地 (1.10285.055, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で培養した。必要に応じて、LB 培地に chloramphenicol (25 µg/mL) (LBcm) もしくは ampicillin (02739-74, Nacalai Tesque, Inc.) (50 µg/mL) (LBamp) を添加した。寒天培地は、液体培地に 1.5%(w/v)の寒天 (01162-15, Nacalai Tesque, Inc.) を添加し作成した。

2-2-3 プライマー

すべてのプライマー (Table 2-2) は Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) に合成を委託した。

2-2-4 遺伝子発現ベクターの構築

一般的な遺伝子工学技術は過去の知見に従った(210)。

mHO-1 をコードする遺伝子 (accession number: NM 010442.2) は *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 のコドン使用頻度に最適化し、合成した (Fig. 2-2)。遺伝子合成は Eurofins Genomics K.K. に委託し、合成遺伝子はプラスミド (pEX-A) を用いてクローニングした。納品されたプラスミドは *E. coli* JM109 を用いて増幅し、以後の実験に用いた。

遺伝子発現ベクターは、乳酸菌用プラスミド (pNZ8148#2:SEC (211), Fig. 2-

3) を用いた。合成遺伝子および pNZ8148#2:SEC は制限酵素 (*KpnI*: 1068A, *XbaI*: 1093A, TaKaRa Bio Inc.) を用いて切断した (Table 2-3)。目的断片は 1% agarose (346-07831, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) ゲルを用いた電気泳動にて確認後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (FG-91202, NIPPON Genetics Co.Ltd, Tokyo, Japan) を用いて精製した。精製 DNA 断片は T4 DNA Ligase (M180A, Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いてライゲーション (Table 2-4) し、*E. coli* MC1061 へ導入した。LBcm 寒天培地上に得られたコロニーはプライマー (Table 2-2, pNZ F3126/pNZ R340) を用いたコロニーPCR (Table 2-5) で解析した。コロニーを LBcm 液体培地に釣菌し、16 - 20 hr 振盪 (220 rpm) 培養後、FastGene Plasmid Mini Kit (FG-90402, NIPPON Genetics Co.Ltd) を用いてプラスミドを抽出した。精製プラスミドはプライマー (Table 2-2, pNZ F3126, pNZ R340) を用いてシーケンス解析 (Eurofins Genomics K.K.に委託) に供した。結果は遺伝子解析ソフト (GENETYX-MAC Ver. 18.0.3, GENETYX, Tokyo, Japan) を用いて解析した。挿入遺伝子に変異・欠損のないことを確認し pNZ8148#2:SEC-mHO-1 (Fig. 2-3) の構築に成功した。

2-2-5 gmNZ9000 の構築

NZ9000 のコンピテントセルは MoBiTec GmbH の説明書通りに調製した。pNZ8148#2:SEC および pNZ8148#2:SEC-mHO-1 は、それぞれ電気穿孔法を用いて NZ9000 に導入した。すなわち、氷冷した 0.1 cm ギャップエレクトロポレーションキューベット (1652089, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) にコンピテントセル懸濁液 (40 μ L) およびプラスミド (100 - 500 ng) を加え、Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてパルス (2,000 V, 25 μ F, 200 Ω) した。キューベットに 500 μ L の氷冷 GM17 SOC 液体培地 (20 mM magnesium chloride (20935-05, Nacalai Tesque, Inc.)、2 mM calcium chloride (06730-15, Nacalai Tesque, Inc.) を含む GM17) を加え、氷上に 5 min 放置した。30°C で 2 hr 静置培養後、GM17cm 寒天培地に播き、さらに一晚培養した。得られたコロニーは GM17cm 液体培地に釣菌し、一晚培養後、終濃度が 20%(v/v) になるようグリセロール (09886-05, Nacalai Tesque, Inc.) を添加し、-80°C で保存した。

2-2-6 組換え遺伝子の発現誘導

組換え遺伝子の発現誘導は、2 mL 系および 50 mL 系で行った。30°C に温めた GM17cm 液体培地に gmNZ9000 の一晚培養液を 5%(v/v) 接種し、OD₆₀₀ =

0.4 になるまで静置培養した。nisin (VS-ELK01000-02, MoBiTec GmbH) を終濃度 1.25 ng/mL になるように培養液に加え、さらに 3 - 4 hr 静置培養した。培養終了後、OD₆₀₀ を測定した。

2-2-7 細胞抽出液および培養液上清画分の調製

2-2-7-1 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) /ウエスタンブロッティング用

2-2-6 の通り、2 mL 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心 (8,000 × *g*, 4°C, 5 min) により細胞ペレットと培養液上清を分離した。細胞ペレットは 1 mL の TES (Table 2-6) に懸濁し、遠心 (8,000 × *g*, 4°C, 5 min) することで洗浄した。得られた細胞ペレットは 70 μL/OD₆₀₀ = 1 の TES-L (5 mg/mL lysozyme chloride (20841-54, Nacalai Tesque, Inc.) および protease inhibitor cocktail (11836153001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含む TES) に再懸濁し、時々ノックをしながら 37°C, 30 min 放置した。放置後、30 μL/OD₆₀₀ = 1 の 20%(w/v) sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) を添加し、さらに 100 μL/OD₆₀₀ = 1 の 2× Laemmli sample buffer (196-11022, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を加えた。溶液を 95°C で 5 min 加温し、SDS 化した。培養液上清を 1,500 μL 回収し、氷冷した 100%(w/v) trichloroacetic acid (T4885, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を 300 μL 加えよく混和した。氷上に 3 hr 放置し、遠心 (20,600 × *g*, 4°C, 15 min) により沈殿物を回収した。沈殿物を 400 μL の acetone (00310-95, Nacalai Tesque, Inc.) に懸濁し、遠心 (20,600 × *g*, 4°C, 15 min) することで洗浄した。洗浄は他に 2 回繰り返した。得られた沈殿物を 50°C で完全に乾燥し、60 μL/OD₆₀₀ = 1 の TE (sucrose を含まない TES) に溶解した。等量の 2× Laemmli sample buffer を加え、室温で一晩放置することで SDS 化した。

2-2-7-2 酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) 用

2-2-6 の通り、2 mL 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心 (8,000 × *g*, 4°C, 5 min) により細胞ペレットを回収した。細胞ペレットは 1 mL の phosphate-buffered saline (PBS, Table 2-7) に懸濁し、遠心 (8,000 × *g*, 4°C, 5 min) することで洗浄した。得られた細胞ペレットは 200 μL/OD₆₀₀ = 1 の protease inhibitor cocktail を含む PBS に再懸濁した。懸濁液を 0.2 φ mm ガラスビーズ (BZ-02, AS ONE Corporation, Osaka, Japan) の入った 2 mL

スクリーキャップ付きチューブに移し、ビーズビーター（ビーズクラッシャー μ T-12, TAITEC Corporation, Saitama, Japan）を用いて菌体を破碎した（3,200 rpm, 1 min \times 3）。遠心（20,600 $\times g$, 4°C, 15 min）により可溶性画分を回収し、菌体抽出液を得た。

2-2-7-3 生理活性試験用

2-2-6 の通り、50 mL 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心（3,000 $\times g$, 4°C, 20 min）により細胞ペレットを回収した。細胞ペレットは 10 mL の 50 mM potassium phosphate (28721-55, Nacalai Tesque, Inc.) buffer (pH 7.4, KPi buffer) に懸濁し、遠心（3,000 $\times g$, 4°C, 20 min）することで洗浄した。洗浄は他に 1 回繰り返した。得られた細胞ペレットは 650 μ L/OD₆₀₀ = 1 の KPi buffer に再懸濁した。2-2-7-2 と同様にビーズビーターを用いて菌体を破碎し、菌体抽出液を得た。

2-2-8 SDS-PAGE/ウエスタンブロッティング

2-2-7-1 で得たサンプル（細胞画分：10 μ L/well, 培養液上清画分：30 μ L/well）は、10%(v/v)ポリアクリルアミドゲル（Table 2-8）を用いた SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE には Running buffer (Table 2-9) を用い、定電流下（10 mA）でサンプルを濃縮後、定電圧下（200 V）でおよそ 50 min 泳動した。泳動終了後、一部のゲルを Coomassie Brilliant Blue R250 (00352, Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) を用いて染色し、バンドを観察した。他方で、未染色のゲルを用いて展開したバンドを PVDF 膜（10600029, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK）に転写した。転写には Transfer buffer (Table 2-10) を用い、定電圧下（100 V）で 1 hr 通電した。転写終了後、膜を 5%(w/v) skim milk (MORINAGA MILK INDUSTRY Co., LTD., Tokyo, Japan) を含む 0.05% (v/v) Tween20 (35624-15, Nacalai Tesque, Inc.) 含 tris-buffered saline (TBS-T, Table 2-11) に室温で 1 hr 浸すことでブロッキングした。適量の TBS-T を用いて膜を 3 回洗浄し、mouse anti-His-tag antibody (1/1000) (652501, BioLegend, San Diego, CA, USA) もしくは rabbit anti-HO-1 antibody (1/1000) (SAB2101053, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を含む TBS-T に 4°C で一晩浸した。適量の TBS-T を用いて膜を 3 回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1/5000) (A4416, Sigma-Aldrich Co. LLC.) もしくは HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1/5000) (A0545, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を含む TBS-T に室温で 1 hr 浸した。発色基質は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent

(RPN2232, GE Healthcare) を用い、バンドは ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いて検出した。

2-2-9 rmHO-1 の定量

2-2-7-2 で得た細胞抽出液に含まれる mHO-1 は、市販の ELISA キット (ab204524, Abcam, Cambridge, UK) を用いて定量した。細胞抽出液は独立した 6 回の実験より調製した。実験手順は説明書に従った。

2-2-10 rmHO-1 の生理活性試験

本試験は、Yoshida & Kikuchi の方法を参考に実施した(212)。Table 2-12 に示す通り、反応溶液を調製した。HO-1 の基質である heme は最後に添加し、酵素反応を開始した。酵素反応は 23°C で 30 min 行い、heme 添加直後 (0 min) と反応後 (30 min) における波長 250 ~ 1000 nm の吸光度を Ultraviolet-visible spectrophotometer (model UV-1800; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) を用いて測定した。実験は 3 回繰り返した。

2-2-11 マウス

7 週齢の C57BL/6 マウス (メス) は、Japan SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。マウスは、照明と室温の管理環境下で飼育し、通常飼料 (MF, Oriental Yeast Co., LTD., Tokyo, Japan) および滅菌水 (一部 3% (w/v) DSS (160110, MP Biomedicals, LLC, Solon, OH, USA) を含む) を自由摂取した。マウスは、2 週間の予備飼育後、実験に供した (9 週齢, 20 ± 2 g)。

2-2-12 接種菌液の調製

2-2-6 の通り、50 mL 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心 ($3,000 \times g$, 4°C, 20 min) により細胞ペレットを回収した。細胞ペレットは 10 mL の PBS に懸濁し、遠心 ($3,000 \times g$, 4°C, 20 min) することで洗浄した。洗浄は他に 1 回繰り返した。得られた細胞ペレットは、 2.5×10^{10} colony forming unit (CFU) /mL になるように PBS に再懸濁し、直ちにマウスに経口投与した。

2-2-13 gmNZ9000 の大腸送達試験

2-2-13-1 経口投与試験のスケジュール

本試験は、Huibregtse et al の方法を参考に実施した(22)。試験のスケジュールは、Fig. 2-4 に示した。マウスに 3% (w/v) DSS を含む滅菌水を 6 日間自由摂

取させることで急性大腸炎を誘導した。誘導後、Disease Activity Index (DAI, Table 2-13) をスコア化し、大腸炎の発症を確認した (data not shown)。健常マウス群は、試験期間を通して滅菌水を自由摂取した。大腸炎誘導期間の終了後、200 μ L の接種菌液 (5×10^9 CFU) もしくは PBS を、30 min に一回、計 10 回、経口ゾンデ (4201, 有限会社フチガミ器械, Kyoto, Japan) を用いてマウスに経口投与した。最終投与の 1 時間後、安楽死したマウスより大腸 (盲腸直下～肛門) を摘出し、2 等分した。実験は 2 回繰り返した。

2-2-13-2 プレーティングアッセイ

カミソリ (FA-10, FEATHER Safety Razor Co., Ltd.) を用いて、遠位大腸を内容物ごと細断し、5 ϕ mm ステンレスビーズ (0068220-000, TAITEC Corporation) および 1,500 μ L の 1% (v/v) fetal bovine serum (SH30910.03, GE Healthcare) を含む PBS (PBS-FBS) の入った 2 mL スクリューキャップ付きチューブに移し、ビーズビーター (3,200 rpm, 30 sec \times 3) を用いて均質化した。得られたホモジェネートは PBS-FBS を用いて 10^5 倍希釈し、100 μ L を GM17cm 寒天培地に播いた。30°C で 2 日間培養後、デジタルカメラで写真撮影した。得られたコロニーを 10 個ランダムに選択し、プライマー (Table 2-2, pNZ F3126/pNZ R340, CreF/LacreR) を用いてコロニーPCR (Table 2-5) に供した。得られた PCR 産物は、1% agarose ゲルを用いた電気泳動にて確認後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit を用いて精製し、プライマー (Table 2-2, pNZ F3126, pNZ R340, CreF, Lacre R) を用いてシーケンス解析 (Eurofins Genomics K.K. に委託) に供した。結果は遺伝子解析ソフト (GENETYX-MAC Ver. 18.0.3) を用いて解析した。

2-2-13-2 免疫組織化学的解析

近位大腸の内容物を除去し、長軸方向に切り開いた。組織をコルクボードに貼り付け、4 % paraformaldehyde (163-20145, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて軽く固定した。カミソリを用いて組織を切り出し、Tissue-Tek O.C.T. compound (4583, Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) に埋没後、液体窒素を用いて包埋した。包埋ブロックは、クリオスタット (Leica CM1900, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) を用いて 10 μ m に薄切し、スライドガラス (S2441, MATSUNAMI GRASS Ind., Ltd., Osaka, Japan) 上に広げた。冷風を当てながら切片を乾燥し、PBS を用いて 3 回洗浄した。75% methanol (21914-03, Nacalai Tesque, Inc.) および 0.03% hydrogen peroxide (18411-25, Nacalai

Tesque, Inc.) を含む蒸留水に室温で 20 min 浸すことで内因性ペルオキシダーゼを失活した。PBS を用いて 3 回洗浄後、10% normal goat serum (50062Z, Invitrogen Corporation, Eugene, OR, USA) に室温で 20 min 反応させた。PBS を用いて 3 回洗浄後、rabbit anti-6× His-tag antibody (1/100) (ab9108, Abcam) に室温で一晩反応させた。PBS を用いて 3 回洗浄後、biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1/300) (AP132B, CHEMICON International, Inc., Billerica, MA, USA) に室温で 20 min 反応させた。PBS を用いて 3 回洗浄後、HRP-conjugated streptavidin (1/300) (474-3000, KPL, Gaithersburg, MD, USA) に室温で 30 min 反応させた。PBS を用いて 3 回洗浄後、抗体構築物は 3,3'-diaminobenzidine (343-00901, Dojindo Laboratories) を用いて発色させた。ヘマトキシリン (8650, Sakura Finetek Japan Co., Ltd.) を用いて核を染色後、光学顕微鏡を用いて観察した。

2-2-14 NZ-HO の抗炎症効果の検討

2-2-14-1 経口投与試験のスケジュール

試験のスケジュールは、Fig. 2-5 に示した。マウスを Fig. 2-5 の通り群分けした。マウスに 3% (w/v) DSS を含む滅菌水を 6 日間自由摂取させることで急性大腸炎を誘導した (Day 0 - 5)。NT 群は、Day 0 から Day 5 まで滅菌水を自由摂取した。Day 5 にすべての飲料水を滅菌水に交換し、試験最終日 (Day 8) まで自由摂取させた。Day -2 から Day 5 まで、200 μ L の接種菌液 (5×10^9 CFU) もしくは PBS を毎日 1 回経口投与した。Day 8 に安楽死したマウスより大腸 (盲腸直下～肛門) を摘出し、内容物を除去後、長さを測定し、3 等分にした。

2-2-14-2 DAI スコア

大腸炎の肉眼症状の指標として、Day 0 から Day 8 まで DAI スコアをモニタリングした。DAI スコアは体重の減少、下痢、血便の重篤度を 0 から 4 点でスコア化したものの総和である (maximum score = 12)。詳細は Table 2-13 に示した。

2-2-14-3 病理組織学的解析

一般的な手法(213, 214)を用いて遠位大腸 ($n = 5 - 7$: 各群 DAI スコアが平均値に近いものを選択) より組織切片を作出し、Siegmund et al の評価システム (215) (Table 2-14) に従って病理組織学的解析を実施した。長軸方向に切り開いた組織をコルクボードに貼り付け、4 % paraformaldehyde を用いて固定し

た。脱水、パラフィン包埋後、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。光学顕微鏡を用いて組織切片を病理組織学的に観察した。

2-2-14-4 ELISA

カミソリを用いて中位大腸 ($n = 5 - 10$: 各群 DAI スコアが平均値に近いものを選択) を細断した。組織片を 5 ϕ mm ステンレスビーズおよび 1 mL の Lysis buffer (Table 2-15) の入った 2 mL スクリューキャップ付きチューブに移し、ビーズビーター (3,200 rpm, 30 sec) を用いて均質化した。遠心 (3,300 $\times g$, 4°C, 5 min) 後、上清を粗タンパク質抽出液として回収し、Pierce BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。粗タンパク質抽出液中の IL-6、IL-10 および TNF- α 濃度は、ELISA キット (IL-6: 88-7064-22, eBioscience Inc., San Diego, CA, USA; IL-10: 88-7105-22, eBioscience Inc.; TNF- α : 860.040.048, Diaclone SAS, Besancon Cedex, France) を用いて測定した。

2-2-14-5 Real-time 定量的 PCR

High Pure RNA Tissue Kit (12033674001, Roche Diagnostics GmbH) を用いて、近位大腸 ($n = 5 - 10$: 各群 DAI スコアが平均値に近いものを選択) より total RNA を精製した。PrimeScript RT reagent Kit (RR037A, TaKaRa Bio Inc.) を用いて 200 ng の total RNA より cDNA を合成し、EASY Dilution (9160, TaKaRa Bio Inc.) を用いて反応溶液を 5 倍希釈した。Real-time 定量的 PCR は Table 2-16 の通り実施した。m β -actin および mL-1 α 特異的プライマーは TaKaRa Bio Inc. より購入した。

2-2-15 統計解析

すべての統計解析は、統計解析ソフトウェア (ystat2004.xls, Igakutosho Shuppan, Tokyo, Japan) を用いて実施した。Real-time 定量的 PCR 解析で得られたデータは、Mann-Whitney U-test を用いて統計解析した。その他のデータは、一元配置分散分析で解析後、多重比較検定 (Tukey-Kramer 法) にて統計学的有意差を検出した。有意水準 α は 0.05 を用いた。

GAAAGACCTCAACCTGATTCAATGCCTCAAGACTTGTCTGAAGCCCTTAAAGAGGCAACGAAAGAAGTCCAT
ATACAAGCTGAAAATGCGGAATTCATGAAGAAGCTTTCAGAAAGGTCAAGTAAGTAGAGAAGGGTTTAACTT
GTCATGGCTTCTTTGTACCACATTTATACAGCATTAGAAGAGGAAATTGAACGTAACAAACAGAATCCCGTT
TATGCACCGTTATACTTTCTGAAGAATTACATCGAAGAGCTGCTTTAGAGCAAGATATGGCCTTTTGGTAT
GGTCCACATTGGCAAGAAATAATTCCATGTACACCAGCCACACAACACTATGTGAAGCGATTACATGAAGTA
GGGAGAACTCATCCGGAAGTATTAGTTGCTCATGCATATACACGCTATTTGGGTGATTTGTCAGGAGGACAA
GTGTTAAAGAAAATTGCACAGAAAGCTATGGCTTTACCATCAAGTGGTGAAGGACTAGCTTTCTTTACCTTT
CCCAATATTGATAGCCCAACGAAGTTTAAACAACACTATATCGTGACGTATGAATACGTTGGAAATGACACCT
GAAGTGAAACACAGAGTAACTGAGGAAGCTAAAACCGCCTTTCTTCTTAATATCGAGTTATTTGAAGAGTTA
CAAGTTATGTTAACTGAAGAACATAAAGACCAATCACCTTCTCAAATGGCATCACTTCGTCAGCGACCAGCG
AGTTTGGTTCAAGATACTGCTCCTGCAGAAACCCCAAGAGGAAAACCAAAATCAGTACATCATCTTCACAA
ACTCCATTATTACAGTGGGTTTTGACACTTAGCTTCTTACTTGCGACTGTTGCAGTTGGCATTATGCCATG

Fig. 2-2 A DNA sequence coding for mouse HO-1 (accession number: NM 010442.2) was synthesized upon codon optimization for *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363.

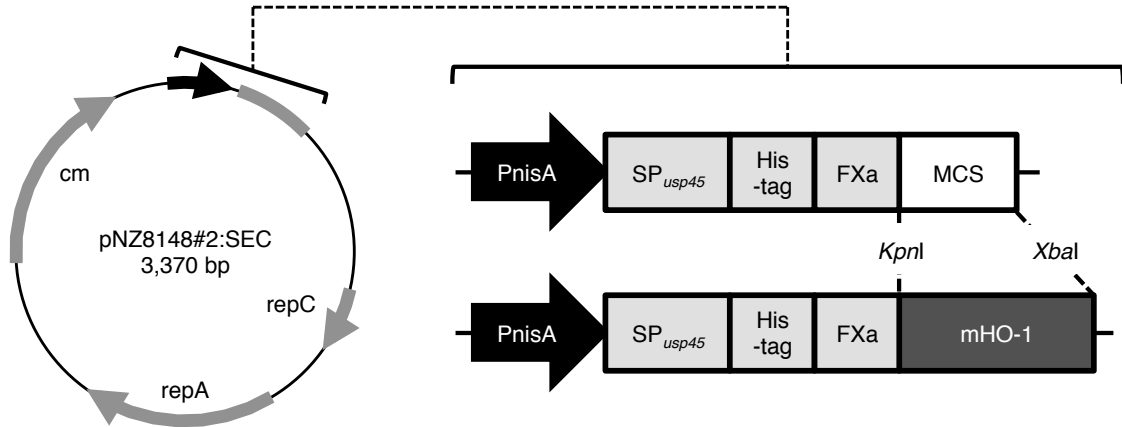


Fig. 2-3 A vector map of the lactococcal secretion vector, pNZ8148#2:SEC (*left panel*). Schematic representations of segments of gene expression cassettes of pNZ8148#2:SEC (*right panel in the upper part*) or pNZ8148#2:SEC-mHO-1 (*right panel in the lower part*) are shown. *PnisA*: nisin A promoter, *SP_{usp45}*: sequence of the signal peptide from the USP45 protein, *His-tag*: hexahistidine-tag, *FXa*: factor Xa recognition site, *MCS*: multiple cloning site, *rep*: replication gene, *cm*: chloramphenicol acetyltransferase gene, *mHO-1*: mouse heme oxygenase-1 gene. The figure is taken from Shigemori et al (216).

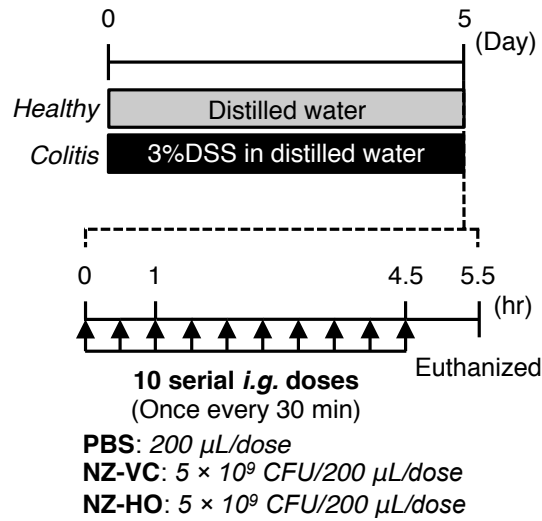


Fig. 2-4 Experimental schedule for a survival test of NZ-HO in the mouse intestine. Acute colitis was induced in mice by free access to drinking water containing 3% DSS for six consecutive days. In the healthy group, mice drank plain water during the induction phase of acute colitis. On the day following treatment, mice were given ten serial oral treatments with PBS (200 µL) or PBS containing NZ-VC or NZ-HO (5×10^9 CFU/200 µL) once every 30 minutes. One hour after the final treatment, mice were euthanized. The figure is taken from Shigemori et al (216).

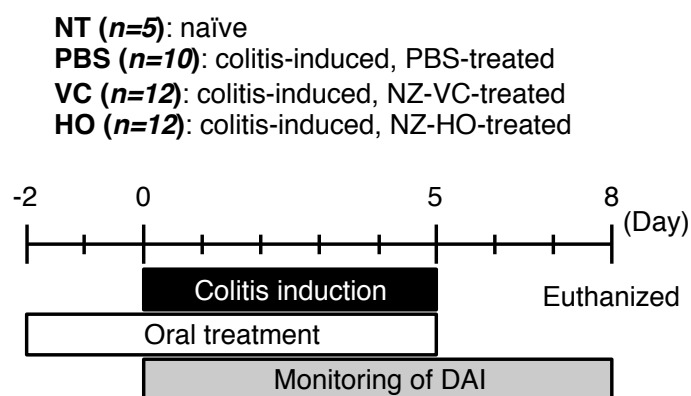


Fig. 2-5 Grouping and experimental schedule for an in vivo trial to evaluate effects of oral administration of NZ-HO on DSS-induced acute colitis in mice. Acute colitis was induced in mice by free access to drinking water containing 3% DSS for six consecutive days. From Day -2 to Day 5, mice were orally administrated once-daily PBS (200 μ L) or PBS containing NZ-VC or NZ-HO (5×10^9 CFU/200 μ L). The Disease Activity Index (DAI) score was monitored from Day 0 to Day 8 to assess the seriousness of the colitis. On Day 8, mice were euthanized. The figure is taken from Shigemori et al (216).

Table 2-2 Primer sequences used in this study.

Name	5'-sequence-3'	Length^{*1}	Ref.^{*2}
CreF	GTGCTTGCACCGATTGAA	19	(217)
LacreR	GGGATCATCTTTGAGTGAT	19	(217)
pNZ F3126	TGCCCCGTTAGTTGAAGAAG	20	This study
pNZ R340	TCAATCAAAGCAACACGTGC	20	This study

^{*1}base

^{*2}references

Table 2-3 Reaction solution and conditions for restriction enzymatic reaction.

Component of reaction solution	
10× M buffer (TaKaRa Bio Inc.)	2 µL
DNA	1 ng
<i>KpnI</i> (1068A, TaKaRa Bio Inc.)	1 µL
<i>XbaI</i> (1093A, TaKaRa Bio Inc.)	1 µL
Ultrapure water	up to 20 µL
Condition for reaction	
37 °C	overnight
75 °C	15 min

Table 2-4 Reaction solution and conditions for ligation.

Component of reaction solution	
10× buffer (Promega Corporation)	2 µL
DNA	8 µL
T4 DNA Ligase (M180A, Promega Corporation)	1 µL
Condition for reaction	
4 °C	overnight

Table 2-5 Reaction solution and conditions for colony-direct PCR.

Component of reaction solution	
EmeraldAmp PCR Master Mix (RR300A, TaKaRa Bio Inc.)	5 µL
Primer mixture (10 µM each)	0.5 µL
Ultrapure water	4.5 µL
Colony	trace
Condition for reaction	
95 °C	5 min
95 °C	30 sec
60 °C (pNZ F3126-pNZ R340) or 45 °C (CreF-LacreR)	30 sec
72 °C	1 min
40 cycles	
4 °C	soak

Table 2-6 Composition of TES.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	10 mM
Ethylenediaminetetraacetic acid (14347-21, Nacalai Tesque, Inc.)	1 mM
Sucrose (30404-45, Nacalai Tesque, Inc.)	25 %
<i>in distilled water</i>	
pH 8.0	

Table 2-7 Composition of PBS.

Disodium phosphate (31801-05, Nacalai Tesque, Inc.)	10 mM
Monopotassium phosphate (28721-55, Nacalai Tesque, Inc.)	1.8 mM
Potassium chloride (28538-75, Nacalai Tesque, Inc.)	2.7 mM
Sodium chloride (09649-15, Nacalai Tesque, Inc.)	137 mM
<i>in distilled water</i>	
pH 7.4	

Table 2-8 Composition of polyacrylamide gel.

Component of running gel	
30%(w/v) acrylamide (018-25625, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	2,700 µL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,000 µL
10% sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	80 µL
10% ammonium persulfate (A3678, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	27 µL
Tetramethylethylenediamine (205-06313, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	4 µL
Distilled water	3,220 µL
Component of stacking gel	
30%(w/v) acrylamide (018-25625, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	400 µL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	625 µL
10% sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	25 µL
10% ammonium persulfate (A3678, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	8.3 µL
Tetramethylethylenediamine (205-06313, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	2.5 µL
Distilled water	1,440 µL

Table 2-9 Composition of Running buffer.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Glycine (17109-35, Nacalai Tesque, Inc.)	14.4 g
Sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	1 g
Distilled water	up to 1 L

Table 2-10 Composition of Transfer buffer.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Glycine (17109-35, Nacalai Tesque, Inc.)	14.4 g
Methanol (21914-03, Nacalai Tesque, Inc.)	100 mL
Distilled water	up to 1 L

Table 2-11 Composition of TBS-T.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Potassium chloride (28538-75, Nacalai Tesque, Inc.)	0.2 g
Sodium chloride (09649-15, Nacalai Tesque, Inc.)	8 g
Tween20 (35624-15, Nacalai Tesque, Inc.)	0.5 mL
Distilled water	up to 1 L

pH 7.4

Table 2-12 Reaction solution for HO-1 reaction in vitro.

Sodium ascorbate (014-04801, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	0.5 mM
Tween20 (35624-15, Nacalai Tesque, Inc.)	0.25%
Heme (H5533, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	0.2 μ M
Cellular extracts from gmNZ9000	500 μ L
50 mM Kpi buffer (pH 7.4)	up to 2 mL

Table 2-13 DAI score.

	Body weight loss	Fecal bleeding	Stool consistency
0	≤ 5 %	negative	normal
1	5 – 10 %		
2	10 – 15 %	slight	loose
3	15 – 20 %	moderate	
4	> 20 %	gross	diarrhea

The DAI score is calculated as sum of the three scores (Max = 12).

Table 2-14 Scoring system for histological evaluation (215).

	Inflammatory cell infiltration	Tissue damage
0	The presence of occasional inflammatory cells in the lamina propria was scored	No mucosal damage
1	Increased numbers of inflammatory cells in the lamina propria	Lymphoepithelial lesions
2	Confluence of inflammatory cells extending into the submucosa	Surface mucosal erosion or focal ulceration
3	Transmural extension of the infiltrate	Extensive mucosal damage and extension into deeper structures of the bowel wall

The histological score is calculated as sum of the two scores (Max = 6).

Table 2-15 Composition of Lysis buffer.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	50 mM
Sodium chloride (09649-15, Nacalai Tesque, Inc.)	150 mM
Triton X-100 (25987-85, Nacalai Tesque, Inc.)	1%
Protease inhibitor cocktail (11836153001, Roche Diagnostics GmbH)	1 tablet/10 mL
<i>in distilled water</i>	
pH 8.0	

Table 2-16 Reaction solution and conditions for real-time quantitative PCR.

Component of reaction solution	
SYBR <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus) (RR820, TaKaRa Bio Inc.)	10 µL
Primer mixture (10 µM each, TaKaRa Bio Inc.)	1 µL
cDNA solution	9 µL
Condition for reaction	
95 °C	10 sec
95 °C	5 sec
60 °C	5 sec
45 cycles	
Dissociation	

2-3 結果

2-3-1 NZ-HO は rmHO-1 を産生・分泌する

CBB 染色において、ナイシン添加培地で培養した NZ-HO 由来の細胞抽出液より rmHO-1 の分泌前駆体 (40.5 kDa) および分泌型 rmHO-1 (37.7 kDa) の分子量に一致するバンドを観察した (Fig. 2-6 A)。ウエスタンブロッティングにおいて、これらのバンドは抗 His-tag 抗体および抗 HO-1 抗体により検出された (Fig. 2-6 B)。また、同細胞抽出液からはおよそ 5 μ g/mL の mHO-1 を検出した (Fig. 2-6 C)。同培養液由来の培養液上清画分からは、分泌型 rmHO-1 の分子量に一致するバンドを検出した (Fig. 2-6 B)。ナイシン添加培地で培養した NZ-VC より調製した細胞抽出液および培養液上清画分からは、rmHO-1 は検出されなかった (Fig. 2-6)。

2-3-2 rmHO-1 は生理活性を有する

In vitro HO 反応系を用いて NZ-HO が産生する rmHO-1 の生理活性を分光光度的に検討した (Fig. 2-7)。HO-1 の基質であるヘムは、400 nm 付近に吸光ピークを有し、酵素反応により分解されることで同ピークの吸光度は減少することが知られている (212)。0 min おいて、Kpi buffer もしくは NZ-VC 由来細胞抽出液を含む反応液では、400 nm 付近をピークとする吸光を観察した (Fig. 2-7 A,B, *Curve I*)。一方で、同時間における NZ-HO 由来細胞抽出液を含む反応液では、HO-ヘム複合体に一致する吸光ピーク (405 nm(212)) を観察した (Fig. 2-7 C, *Curve I*)。反応 30 分後、各反応液の吸光パターンは *Curve II* に安定化した (Fig. 2-7 A-C)。NZ-HO 由来細胞抽出液を含む反応液において 0 min で観察されたピークの吸光度は著しく減少した (Fig. 2-7 C, *Curve III*, Fig. 2-7 D)。一方、NZ-VC 由来細胞抽出液を含むもしくは含まない反応溶液における同ピークの吸光度は、反応前後において考慮すべき変化は観察されなかった (Fig. 2-7 A,B, *Curve III*, Fig. 2-7 D)。

2-3-3 NZ-HO は rmHO-1 を大腸粘膜へ運搬する

経口投与された NZ-HO の大腸到達性や大腸粘膜における rmHO-1 の産生を検討するために、マウスを用いた経口投与試験を実施した。gmNZ9000 (NZ-VC もしくは NZ-HO) を経口投与したマウスの大腸よりコロニーを得た (Fig. 2-8 A)。これらを、*L. lactis* subsp. *cremoris* (CreF/LacreR) もしくは pNZ8148 (pNZ F3126/pNZ R340) に特異的なプライマー (Table 2-2) を用いてコロニーダイレクト PCR に供したところ、予想されるサイズに一致する DNA 断片を観察した

(Fig. 2-8 B,C)。また、PCR 産物を DNA シーケンス解析に供し、予想される配列に一致することを確認した (data not shown)。PBS 投与マウスの大腸からはコロニーは回収されなかった (Fig. 2-8 A)。免疫組織化学において、gmNZ9000 投与マウスの大腸粘膜に抗 His-tag 抗体の陽性反応を得た (Fig. 2-8 D)。一方で、PBS 投与マウスでは陽性反応は観察されなかった (Fig. 2-8 D)。健常 (*Normal colon*) および大腸炎 (*Inflamed colon*) マウスにおいて同様の結果を得た (Fig. 2-8)。

2-3-4 NZ-HO はマウスにおける DSS 誘導急性大腸炎を軽減する

2-3-4-1 DAI スコア (Fig. 2-9 A)

NT 群は、試験期間を通して DAI スコアは 0 であり、大腸炎を発症しないことを確認した。PBS 群は、経過日数依存的な DAI スコアの増加が認められ、Day 8 には 8.30 ± 0.43 に達し、大腸炎症状の発症が観察された。同様の傾向は NZ-VC 群において観察された。一方で、NZ-HO 群の Day 8 における DAI スコアは 4.25 ± 0.82 であり、PBS 群および NZ-VC 群と比較して有意に低かった。

2-3-4-2 大腸の長さ (Fig. 2-9 B)

炎症による組織障害の指標として、Day 8 に大腸の長さを測定した。PBS 群は、NT 群と比較して著しい大腸の短縮が観察された。同程度の短縮は、NZ-VC 群でも観察された。PBS および NZ-VC 群と比較して、NZ-HO 群における大腸の短縮は著しく軽減した。

2-3-4-3 大腸組織の病理組織学的解析

NT 群の大腸組織切片では、Table 2-14 に定義される病理組織学的炎症は観察されなかった (Fig. 2-9 E)。従って、病理スコアは 0 点だった (Fig. 2-9 D)。一方で、PBS 群のマウスのほとんどで、粘膜から粘膜下層に至る炎症細胞の浸潤 (6/7) と粘膜における散発的なびらん/潰瘍 (5/7) が観察された (Fig. 2-9 F)。加えて、2/7 のマウスにおいて、より深刻な組織障害が観察された。NZ-VC 群では、PBS 群と同等の病理組織学的炎症が観察された (Fig. 2-9 G)。従って、PBS 群および NZ-VC 群の病理スコアは、NT 群と比較して有意に増加した (Fig. 2-9 D)。これらの群と比較して、NZ-HO 群の病理スコアは有意に減少した (Fig. 2-9 D)。NZ-HO 群において、粘膜から粘膜下層に至る炎症細胞の浸潤 (3/7) や粘膜における散発的なびらん/潰瘍 (2/7) を観察したマウスは、PBS 群および NZ-VC 群と比較して半減した (Fig. 2-9 H)。また、深刻な組織障害は観察されず、

3/7 のマウスにおいて病理組織学的炎症は観察されなかった。

2-3-5 NZ-HO は大腸組織におけるサイトカインの発現を調節する

NZ-HO の大腸炎軽減効果の分子メカニズムを検討するために、大腸組織における炎症性サイトカイン (IL-1 α , IL-6, TNF- α) および抗炎症性サイトカイン (IL-10) の発現レベルを検討した。NT 群と比較して、PBS 群および NZ-VC 群において、IL-6 (Fig. 2-10 A) および IL-1 α mRNA (Fig. 2-10 C) の発現レベルが著しく増加した。NZ-VC 群と比較して、NZ-HO 群におけるこれらの発現レベルは有意に減少した (Fig. 2-10 A,C)。TNF- α の産生レベルは、各群間に有意な違いは観察されなかった (Fig. 2-10 B)。IL-10 の産生レベルは、NT 群と比較して、PBS 群および NZ-VC 群において有意に減少した。NZ-HO 群における IL-10 の産生レベルは、NZ-VC 群と比較して有意に高かった (Fig. 2-10 D)。

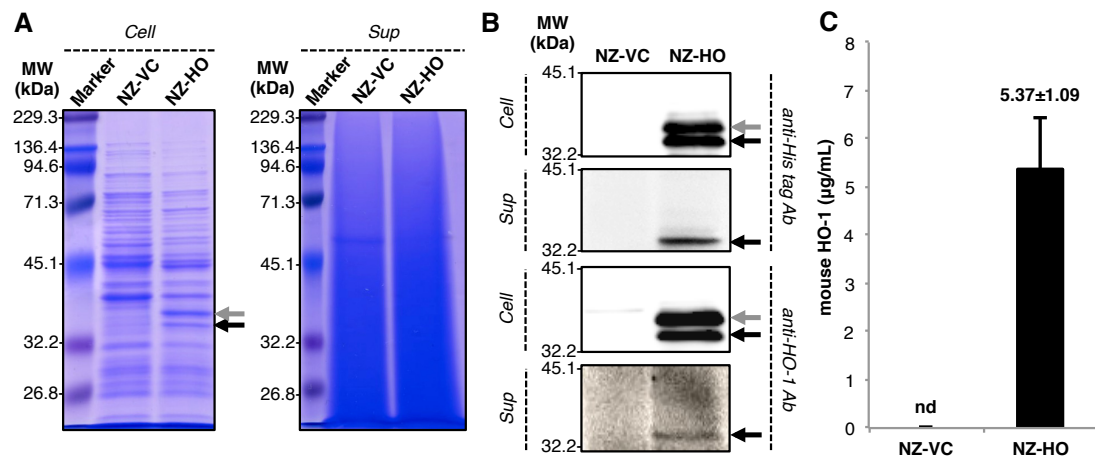


Fig. 2-6 Detection and quantification of recombinant mHO-1 produced by NZ-HO. Recombinant gene expression was induced in gmNZ9000 with nisin. (A,B) Cellular extracts (*Cell*) and culture supernatants (*Sup*) were analyzed with SDS-PAGE (A) or western blotting using anti-His-tag or anti-HO-1 antibodies (B). MW indicates the molecular mass markers (kDa). *Gray* and *black* arrows indicate the precursor of secreted rmHO-1 (pre-rmHO-1, 40.5 kDa) and the secreted form of rmHO-1 (rmHO-1, 37.7 kDa), respectively. Representative images from three independent experiments were shown. (C) mHO-1 in cellular extracts from nisin-induced gmNZ9000 was quantified by ELISA. Data are the mean \pm SD (n = 6). *nd*: not detected. The figure is taken from Shigemori et al (216).

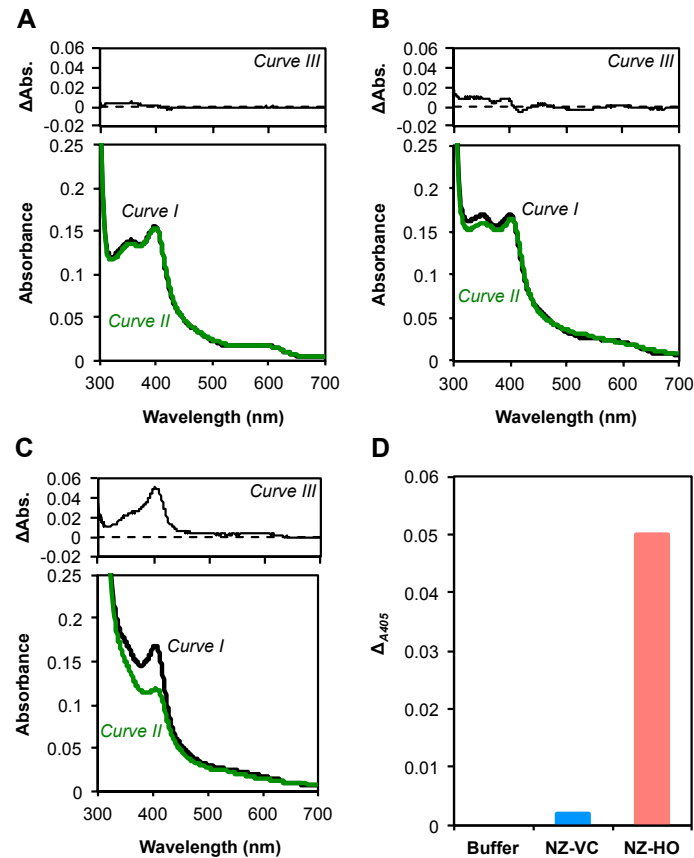


Fig. 2-7 Bioactivity assay of recombinant mHO-1. The absorption spectra of the reaction mixtures containing Kpi buffer (A) and cellular extracts from nisin-induced NZ-VC (B) or NZ-HO (C) were measured at the starting point of the assay (A_{0min} , Curve I) and after 30 min of incubation at 23°C (A_{30min} , Curve II). The differential spectra ($A_{0min} - A_{30min}$, Curve III) are presented in the upper graph. (D) The absorbance changes at 405 nm are shown. Similar results were obtained from three independent experiments, and representative data are shown. The figure is taken from Shigemori et al (216).

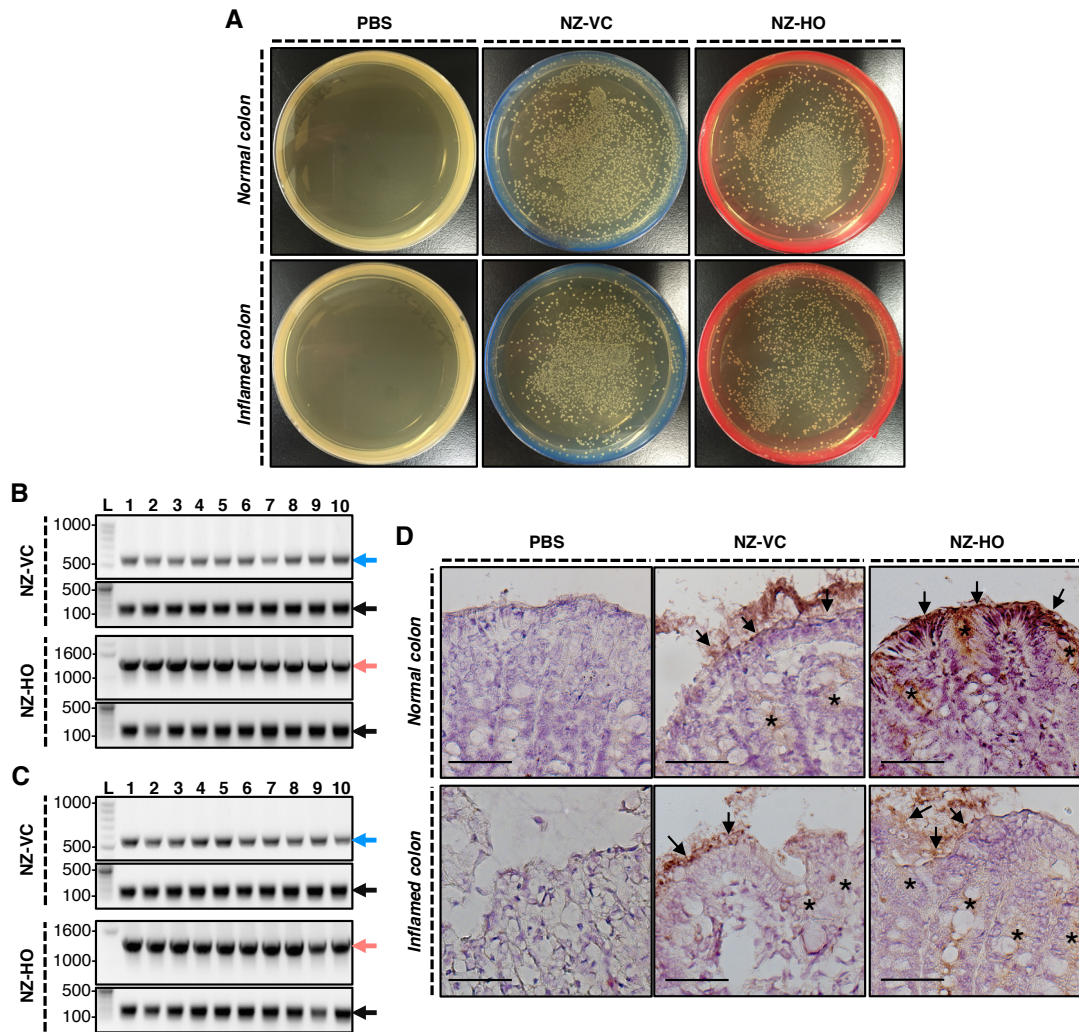


Fig. 2-8 Survival of NZ-HO in the mouse intestine. (A) Homogenates of the entire colon (including luminal contents) were plated on GM17cm agar. (B,C) Ten single colonies were randomly chosen for each sample from healthy (C) or colitis (D) mice and were subjected to colony-direct PCR with pNZ8148-specific (*upper images of each group*) or *L. lactis* subsp. *cremoris*-specific (*lower images of each group*) primer pairs. Bands indicated by *blue* (586-bp), *salmon pink* (1,403-bp), and *black* allows (163-bp) were further analyzed by the DNA-sequencing, and were in accord with the putative sequences. *L*: DNA ladder (bp). (E) Immunohistochemical staining/detection of His-tagged proteins in colonic tissue. Positive reactions were observed in the mucosal epithelial cells (*arrows*) and in the lamina propria (*asterisks*) of the colon from gmNZ9000-treated mice. Bars = 50 μ m. Normal colon and Inflamed colon mean colons from healthy (mice that drank sterile water) or colitis (mice that drank DSS in the water) mice, respectively. Similar results were seen in two different mice. Representative images are shown. The figure is taken from Shigemori et al (216).

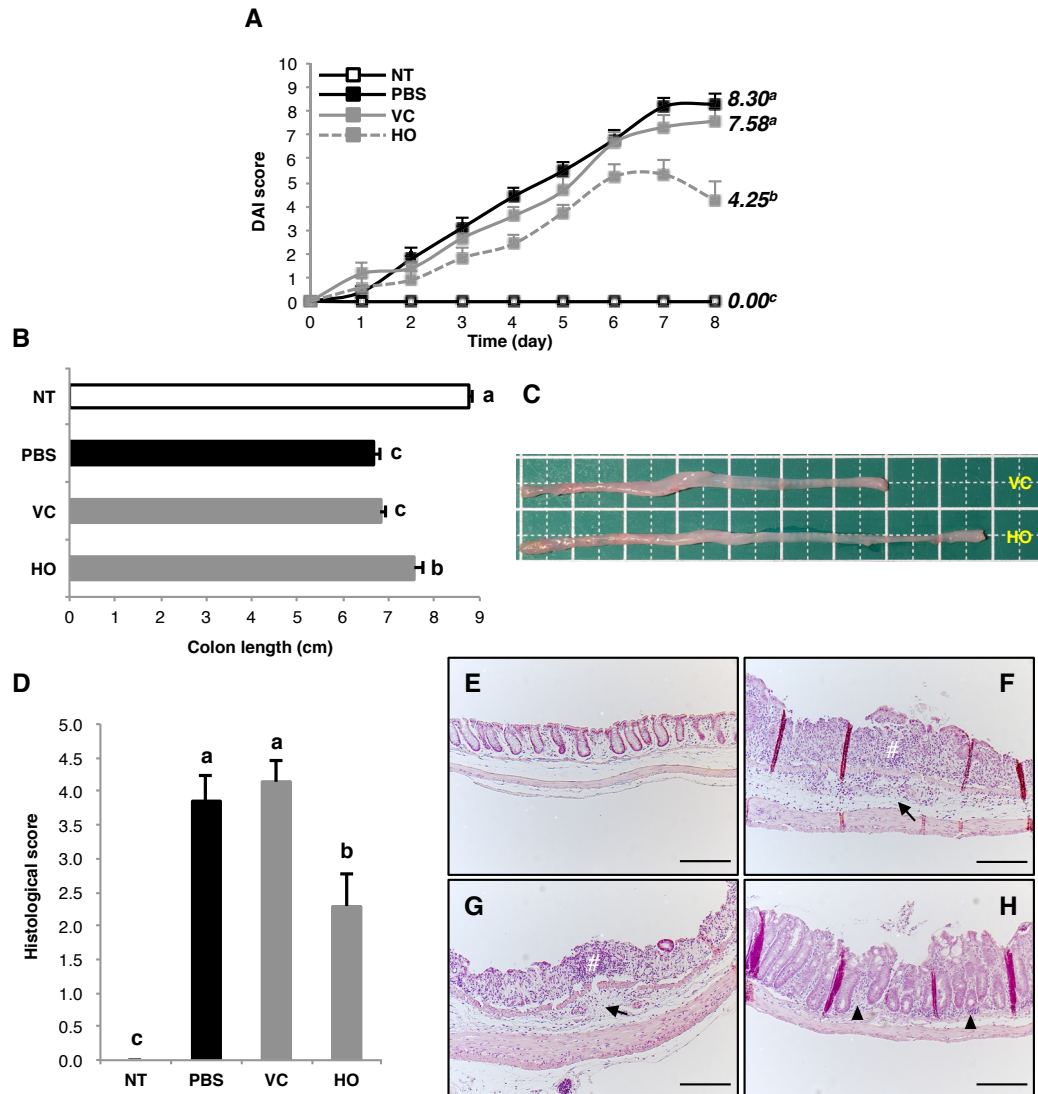


Fig. 2-9 Effects of oral administration of NZ-HO on DSS-induced acute colitis in mice. (A) Chronological change in the DAI score of mice in each group. Data are the mean + SE ($n = 5-12$). (B) On day 8, the colon length (*i.e.*, just under the cecum to the anus) was measured. Data are the mean + SE ($n = 5-12$). (C) Representative images of the colon from the VC and HO groups are shown. Bars = 1 cm. (D) Histogram of histological scores on day 8. Data are the mean + SE ($n = 5-7$). (E-H) Representative images of HE-stained colonic sections indicating the average DAI for each group are shown in the NT (E), PBS (F), VC (G), and HO (H). In the PBS and VC groups, inflammatory cell infiltration into the submucosa (*arrows*) and severe tissue damage (*i.e.*, erosion and ulcers, #) were observed. An increase in the number of inflammatory cells in the lamina propria was observed in the HO group (*arrowhead*). Bars = 100 μ m. Letters (*i.e.* a, b, c) represent significant differences ($P < 0.01$). The figure is taken from Shigemori et al (216).

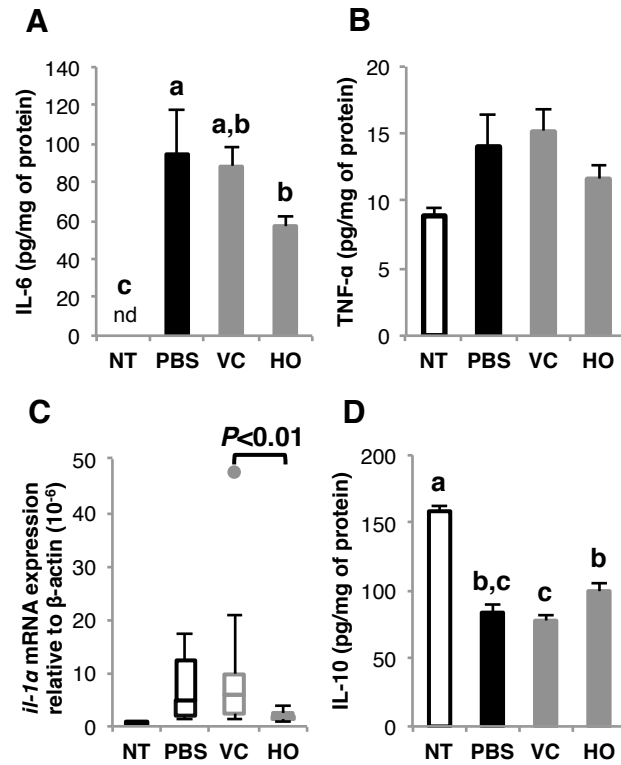


Fig. 2-10 The modulating effect of NZ-HO on the expression of cytokines in colonic tissue. Protein extracts and total RNA were prepared from the middle or proximal colon on day 8, respectively. Protein levels of IL-6 (A), TNF-α (B), and IL-10 (D), and the gene expression of IL-1α (C) were analyzed with ELISA (A, B, D) or real-time qPCR (C). Data from ELISA are the mean + SE ($n = 5-10$). Values for the real-time qPCR analysis are shown as a box plot ($n = 5-7$). Letters (*i.e.* a, b, c) represent significant differences ($P < 0.05$). *nd*: not detected. The figure is taken from Shigemori et al (216).

2-4 考察

本研究でははじめに、mHO-1 の腸管運搬体として、NZ-HO を構築した。ナイシン添加培地で培養した NZ-HO の細胞抽出液より、rmHO-1 分泌前駆体 (SP_{usp45}-mHO-1 融合タンパク質) を検出した。また、同培養液由来の上清画分において分泌型 rmHO-1 (SP_{usp45} 切断型) を検出した。SP_{usp45} は、NZ9000 に内因する分泌タンパク質 USP45 のシグナルペプチドである(218)。すなわち、NZ-HO はナイシン刺激に応答し、rmHO-1 分泌前駆体を細胞内に産生後、それらをシグナルペプチド依存的に細胞外へと分泌することが示唆された。以上の結果より、rmHO-1 を分泌する gm-NZ9000 の構築に成功した。

続いて、NZ-HO が産生する組換えタンパク質の生理活性を検討した。HO-1 は、基質であるヘムを段階的に分解し、最終産物としてビリベルジン、CO および遊離鉄を生成する(172, 219) (Fig. 2-11)。本酵素反応は、いくつかの in vitro 系において再現されており、その過程は分光学的に特徴付けられている(212, 220-228)。本研究は、電子供給体として NADPH-シトクロム P450 還元酵素の代わりにアスコルビン酸を用いた改変 in vitro HO 反応系(212)を用いた。反応開始直後 (0 min)、buffer もしくは NZ-VC 由来細胞抽出液を含む反応液において、400 nm 付近をピークとする強い吸光を観察した。一方、同時間において NZ-HO 由来細胞抽出液を含む反応液で観察された吸光ピークは、これらのものと比較してわずかに長波長側にシフトした (405 nm)。本酵素反応は、HO がヘムと複合体を形成することにより開始される(172)。ヘム-HO 複合体は、本反応系において還元剤非依存的に直ちに形成され、その吸光ピーク (405 nm) は遊離ヘム (402 nm) と比較してわずかに長波長側にシフトすることが報告されている(212, 228)。すなわち、NZ-HO 由来細胞抽出液を含む反応液では、反応開始後直ちに、ヘム-HO-1 複合体が形成されていることが示唆された。反応 30 min 後、NZ-HO 由来細胞抽出液を含む反応液は、400 nm 付近に小さなピークを示す吸光パターンに安定化し、405 nm の吸光度は 0 min と比較して著しく低下した。一方で、buffer もしくは NZ-VC 由来細胞抽出液を含む反応液では、吸光パターンの著しい変化は認められなかった。本研究で用いた改変 in vitro HO 反応系では、ヘムの最終分解産物として、ビリベルジンではなく、その前駆体の Fe³⁺-ビリベルジン-HO 複合体 (Fig. 2-11) を生成することが報告されている(212, 226)。Fe³⁺-ビリベルジン-HO 複合体のソーレ帯における吸光ピークは 400 nm 付近である(212)。これは、ビリベルジン (380~390 nm) と比較して長波長であり、ヘムもしくはヘム-HO 複合体と比較してその吸光度は著しく低い(212)。すなわち、反応 30 min 後における NZ-HO 由来細胞抽出液を含む反応液では、Fe³⁺-ビリベルジン-HO 複合体が生成したことが考えられた。まとめると、NZ-HO が産生す

る rmHO-1 は、本反応系においてヘムと複合体を形成し、最終産物として Fe^{3+} -ビリベルジン-HO 複合体を生成することが示唆された。以上の結果から、rmHO-1 はヘムの分解を触媒する酵素活性を有すると結論付けた。

健常および DSS 大腸炎マウスを用いた経口投与試験において、NZ-HO の大腸到達性を検討した。NZ-HO を連続経口投与したマウスの大腸より、NZ-HO の生菌を単離・同定することに成功した。続いて、抗 His-tag 抗体を用いた免疫組織化学的解析において、大腸粘膜における rmHO-1 の検出を試みた。本研究では、rmHO-1 を特異的に検出するために（生体内因性 HO-1 と区別するために）、抗 His-tag 抗体を用いた。NZ-HO 投与マウスの粘膜表面や陰窩、粘膜固有層に抗 His-tag 抗体に対する陽性反応を得た。以上の結果から、NZ-HO は経口投与された後、生きて大腸へ到達し、大腸粘膜へ rmHO-1 を運搬することが示された。一方で、NZ-VC 投与マウスの大腸粘膜においても、NZ-HO 投与群と同様に、抗 His-tag 抗体に対する陽性反応を観察した。NZ-VC は、ナイシン刺激依存的に、保有する空ベクター（pNZ8148#2:SEC, Fig. 2-3）に由来する His-tagged ペプチドを産生する(229)。NZ-VC 投与マウスの大腸より GM17cm 上に回収した菌株は、同空ベクターを有していた。すなわち、観察された陽性反応は、同 His-tagged ペプチドに由来するものと考えられた。

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。マウス（C57BL/6 や BALB/c）に 1 - 5 % の DSS を含む飲料水を摂取させると、体重減少や下痢、血便といった症状を伴う急性大腸炎を発症する(230, 231)。大腸における炎症障害は、大腸の短縮や組織学的病変（陰窩構造の破壊や炎症細胞の浸潤等）に特徴付けられており、炎症性サイトカインやミエロペルオキシダーゼは定量可能な炎症マーカーとして利用される(232-234)。これらの症状や生理反応は UC と類似点を多数有しており(235)、その再現性は極めて高いことから、IBD モデルとして有用である。そこで本研究は、本モデルを用いて NZ-HO の大腸炎軽減効果を検討した。NZ-HO の連日経口投与は、等量等頻度の NZ-VC の投与と比較して、DSS に誘導される DAI スコアの増加、大腸の短縮および病理組織学的病変を著しく軽減した。すなわち、NZ-HO を用いた rmHO-1 分子の大腸への直接的な運搬は、マウスにおける DSS 誘導急性大腸炎を軽減することが明らかになった。

HO-1 が発揮する抗炎症作用は、ヘムの分解産物（CO、ビリベルジン）やその誘導体（ビリルビン）が媒介することから、多様なメカニズム（免疫調節、抗酸化、抗アポトーシス等）を介する(171)。中でも、HO-1 が発揮する免疫調節作用は、実験的大腸炎の軽減において重要な役割を担っていることが示唆されている(173, 174, 236)。そこで本研究は、NZ-HO の DSS 大腸炎軽減メカニズムとし

て、大腸組織における各種サイトカイン (IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF- α) の発現を検証した。NZ-HO の連日経口投与は、等量等頻度の NZ-VC の投与と比較して、DSS 大腸炎により低下した IL-10 の産生を有意に増加した。また、NZ-HO は DSS 投与に誘導された大腸への炎症細胞の浸潤や大腸組織における炎症性サイトカイン (IL-1 α , IL-6) の発現レベルを著しく減弱した。IL-10 は、抗炎症作用を発揮するサイトカインであり、腸管の免疫恒常性の維持において必須の生体因子である (237)。実際に、*IL10* 遺伝子の多型は IBD の発症因子に関連付けられており (238-240)、IL-10 や IL-10 受容体 (R) を欠損したマウスは重篤な GIT 炎症を自然発症する (241, 242)。単球/マクロファージにおいて、HO-1 は CO の生成を介して IL-10 と正のフィードバックサーキットを形成する (243-245)。重要なことに、本機構の駆動は、炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α 等) の減少を伴い、実験的大腸炎を軽減することが示された (180, 183, 245, 246)。一方で、HO-1 は実験的大腸炎における T 細胞環境を調節することが報告されている (187, 188, 247)。制御性 T 細胞 (Treg) は、主に抗炎症サイトカイン (IL-10 や transforming growth factor- β) を分泌するヘルパー T 細胞サブセットである。hemin を用いた内因性 HO-1 の活性化は、DSS 大腸炎マウスの腸間膜リンパ節における CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Treg の増殖と頻度および大腸組織における IL-10 mRNA 発現を増加することが示された (187, 188)。加えて、抗原提示細胞における HO-1 の活性化は、Treg の機能を調節し、免疫抑制作用を発揮することが報告された (247)。一方で、hemin の投与は DSS 大腸炎マウスの腸管における Th17 細胞の頻度と Th17 関連サイトカイン (IL-17A) の産生を減弱することが報告された (187, 188)。Th17 は、Th17 関連サイトカイン (IL-17 や IL-23) を産生するヘルパー T 細胞サブセットであり、IBD の病理形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている (248, 249)。Th17 の分化において、IL-1 や IL-6 は中心的な役割を担う炎症性サイトカインである。In vitro 細胞培養系において、hemin は IL-6/IL-6 受容体経路を阻害することで Th17 細胞の分化を抑制することが示された (187)。IL-1 や IL-6 を始めとする炎症性サイトカインは大腸の炎症病変部位に浸潤した免疫細胞 (好中球やマクロファージ等) により大量に産生される。HO-1 誘導剤の投与は、これらの産生や浸潤を抑制することが示された (178, 250)。以上の事柄から、NZ-HO が発揮する DSS 誘導急性大腸炎の軽減作用には、大腸粘膜に運搬された rmHO-1 による免疫調節作用 (IL-10 の誘導、炎症細胞の浸潤および炎症性サイトカイン発現の抑制) が関与していることが示唆された。

まとめると、生理活性を有する rmHO-1 を分泌する *gm-L. lactis* (NZ-HO) の構築に成功した。続いて、経口投与された NZ-HO は、生きて大腸に到達し、

大腸粘膜へ rmHO-1 を運搬することを明らかにした。NZ-HO の連日経口投与は、DSS 誘導急性大腸炎の症状を軽減することを示した。また、NZ-HO は同腸炎マウスの大腸におけるサイトカイン発現を調節することが明らかになり、同反応は大腸炎の軽減に関連することが示唆された。これらの結果から、NZ-HO を用いた rmHO-1 の腸管デリバリーは、IBD の新しい予防・軽減戦略として有効であることが示唆された。

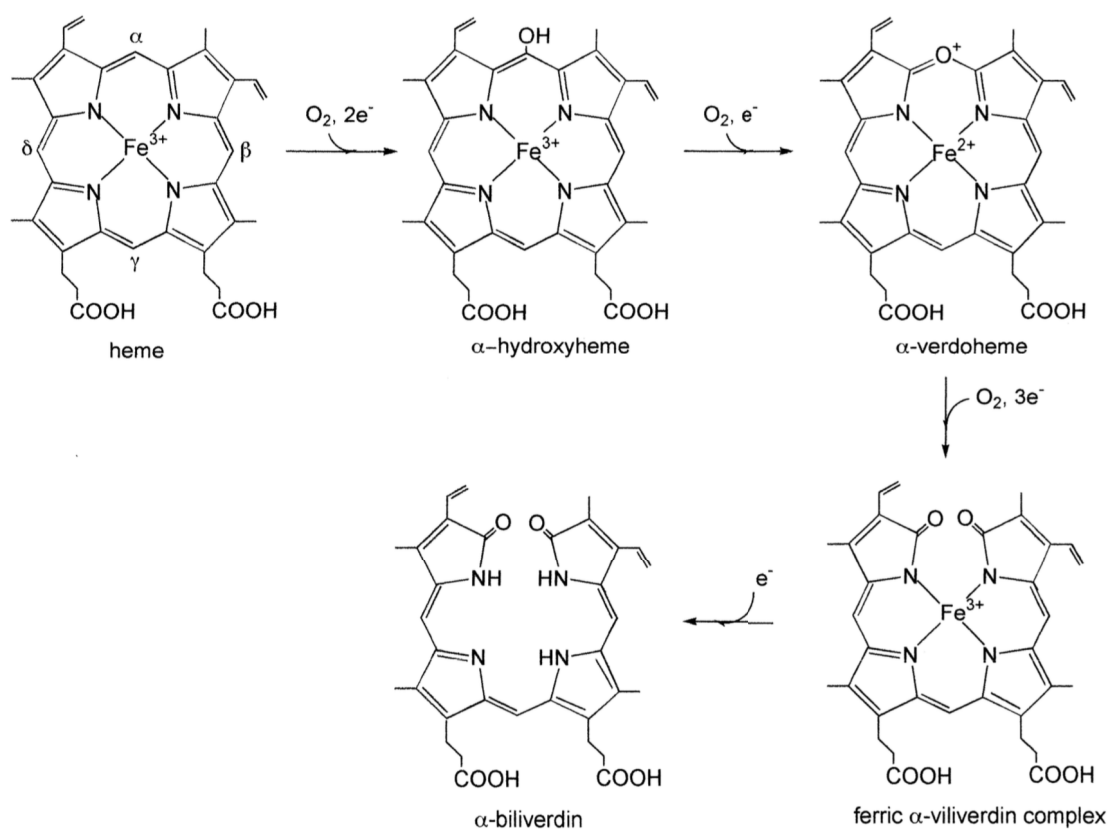


Fig. 2-11 Scheme of stepwise heme degradation catalyzed by HO. The figure is a modified version of Yoshida et al (219).

第三章

免疫活性を有する抗インターロイキン-6 抗体の single-chain variable fragment を分泌する *Lactococcus lactis* 組換え体の構築

3-1 緒言

インターロイキン (IL) -6 は、炎症や免疫反応、血球新生において多面的な生理機能を発揮するサイトカインである (Fig. 3-1) (251-253)。IL-6 は、IL-6 受容体 (R) および細胞膜上に存在する gp130 と複合体を形成し、以下の細胞内シグナリング (JAK (Janus kinase)-STAT (signal transducer and activator of transcription) 経路や JAK-SHP-2-MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路) を活性化することで生理機能を発揮する (IL-6 シグナリング) (Fig. 3-2) (251, 254)。gp130 は、ほとんどの細胞の細胞膜上に普遍的に発現する糖タンパク質であり、IL-6 シグナリングにおいて、IL-6-IL-6R の相互作用と以下の細胞内シグナリングの活性化を架橋するトランスデューサーの役割を担っている (255, 256)。一方で、IL-6R は IL-6 を補足する役割を担っており (それ自身に細胞内シグナルを活性化させる能力はない)、生体内では生理的に有意義な 2 種の形態 (膜結合型 IL-6R および分泌型 IL-6R) が存在する (253)。膜結合型 IL-6R は、主に白血球や巨核球、幹細胞に発現し、in situ において IL-6-IL-6R-gp130 複合体を形成後、シグナリングを活性化する (Classical IL-6 receptor signaling) (251, 257)。一方、分泌型 IL-6R は単球や T 細胞から放出された形態で、IL-6 に結合し細胞膜上の gp130 と会合することでシグナリングを活性化 (IL-6 trans-signaling) (258)。IL-6 は、上記 2 種の機構を介することで、IL-6R を発現する細胞のみならず、IL-6R が存在しない細胞にも影響を及ぼすことができ、その多面的な生理機能を実現している (259)。

IL-6 シグナリングは、感染や組織傷害といった環境刺激に対して急性かつ一過的に活性化し、生体防御において重要な役割を担う (260)。一方で、同経路の調節不全とそれにともなう慢性的な活性化は、炎症性疾患や自己免疫疾患の発症や維持、腫瘍の発生や転移に関連付けられている (Fig. 3-1) (251, 253)。従って、IL-6 シグナリングを阻害するモノクローナル抗体 (抗 IL-6 抗体: Sirukumab, Olokizumab, Clazakizumab、抗 IL-6R 抗体: Tocilizumab, Sarilumab, Siltuximab) は、これら疾患の治療薬としての利用が期待されている (251, 253, 257)。実際に、ヒト化抗 IL-6R 抗体 (Tocilizumab) は、炎症性自己免疫疾患の関節リウマチにおける治療効果が認められており、中程度から重度の活動性症状を示す患者への第一選択薬として 100 カ国以上で用いられている (253, 261)。また、これまでの基礎もしくは臨床研究は、若年性特発性関節炎 (262, 263) やキャスルマン病 (264-266)、全身性エリテマトーデス (267-269)、全身性硬化症 (270) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01532869)、クローン病 (271, 272)、喘息 (273)、関節リウマチ (274) における IL-6 シグナリングのブロック抗体の有効性を示唆している。しかし、抗体薬は極めて高価であり、家庭および社会

に大きな経済的損害を与える可能性がある。例えば、関節リウマチ治療に必要なアクテムラ（Tocilizumab の販売名）の薬価はおよそ 130 万円/年である（患者が 60 kg の場合）（2016 年 12 月現在）。

そこで本研究は、IL-6 ブロッキング抗体の安全・安価な産生体および粘膜運搬媒体の開発を目指し、抗マウス IL-6 抗体の single-chain variable fragment（scFv）（IL6scFv）を産生する乳酸菌（*Lactococcus*（*L.*）*lactis*）組換え体（genetically modified lactic acid bacteria: gmLAB）を構築することを目的とした。scFv は、抗体分子中の H 鎖および L 鎖の可変領域をフレキシブルな可変リンカーで接続した分子である(275)。本抗体分子は、大腸菌等の微生物において生理活性のある組換えタンパク質として産生させることが可能である。本章でははじめに、IL6scFv を組換えタンパク質として産生・分泌する gm-*L. lactis* の構築結果についてを示す。続いて、組換え遺伝子の発現誘導条件を検討し、組換え IL6scFv（rIL6scFv）の分泌量の最適化について示す。最後に、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）にて、rIL6scFv の免疫活性結果について示す。

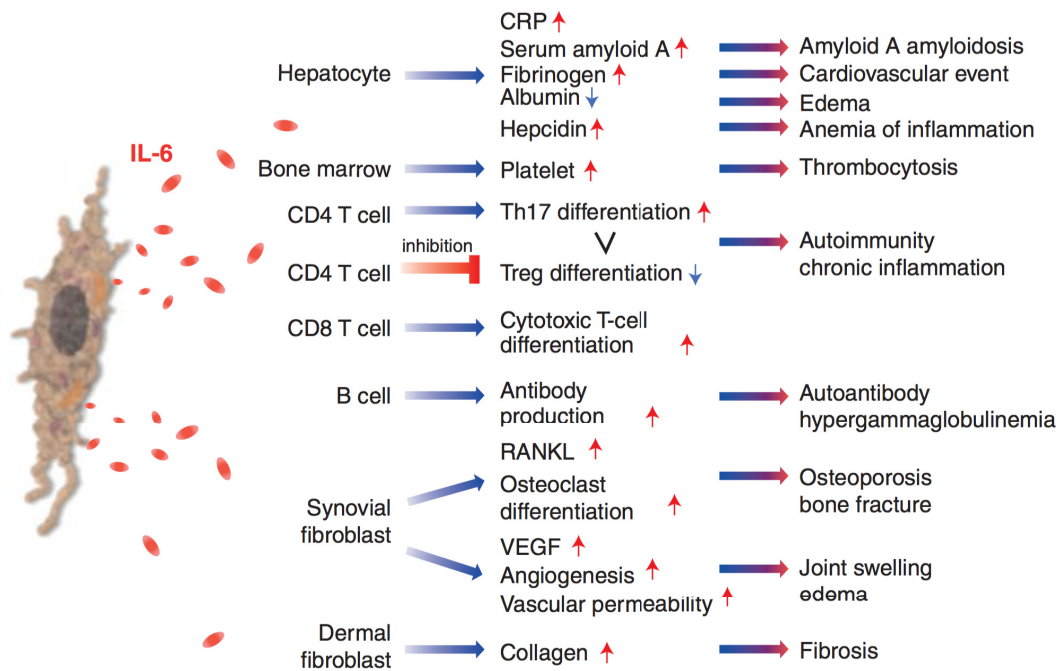


Fig. 3-1 IL-6 in inflammation, immunity, and disease. IL-6 is a cytokine featuring pleiotropic activity; it induces synthesis of acute phase proteins such as CRP, serum amyloid A, fibrinogen, and hepcidin in hepatocytes, whereas it inhibits production of albumin. IL-6 also plays an important role on acquired immune response by stimulation of antibody production and of effector T-cell development. Moreover, IL-6 can promote differentiation or proliferation of several nonimmune cells. Because of the pleiotropic activity, dysregulated continual production of IL-6 leads to the onset or development of various diseases. Treg, regulatory T cell; RANKL, receptor activator of nuclear factor κ B (NF- κ B) ligand; VEGF, vascular endothelial growth factor. The figure and its legend are taken from Tanaka et al (253).

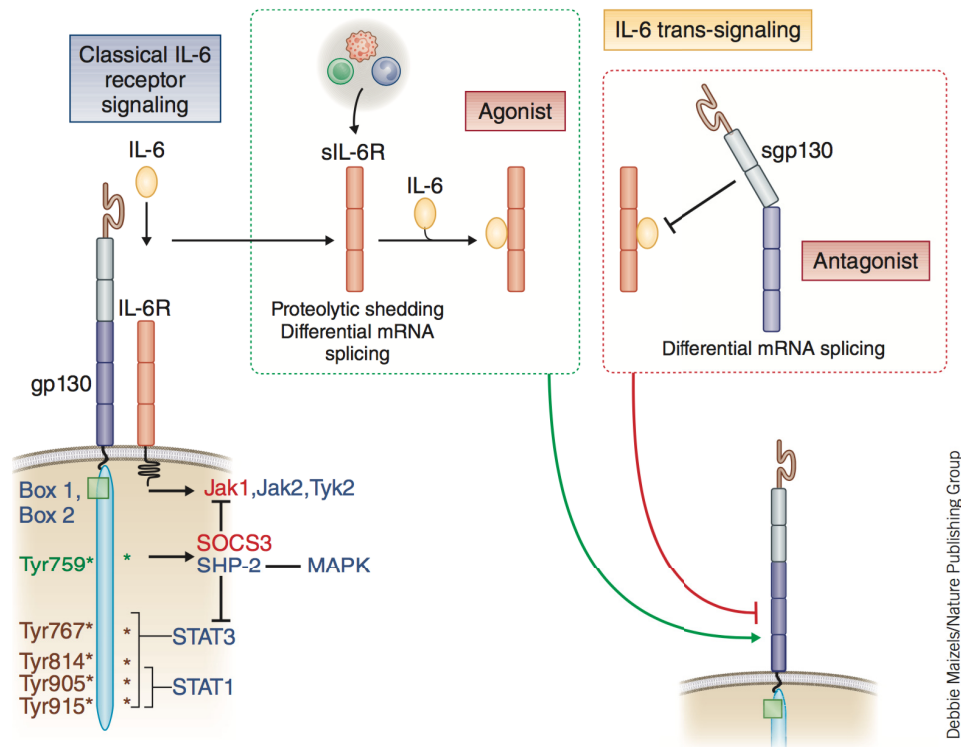


Fig. 3-2 Two distinct modes of IL-6 receptor signaling. Classical IL-6 receptor signaling occurs in cells that express IL-6R (CD126) and gp130 (CD130). IL-6R is a non-signaling receptor that binds IL-6. The gp130 subunit is the signal-transducing receptor for IL-6 and its related family members. A soluble form of IL-6R is released from the cell surface by proteolysis and splicing of IL-6R mRNA, and can bind IL-6 to form an agonistic complex that signals through gp130. This mechanism of trans-signaling allows IL-6 to act on cells that lack IL-6R. A fully functioning IL-6 receptor complex consists of a hexameric structure in which IL-6, IL-6R and gp130 exist in a 2:2:2 stoichiometry. Both modes of IL-6 receptor signaling lead to gp130 activation of Jak1, Jak2 and Tyk2, which bind box 1 and box 2 sites within the gp130 sequence and a series of proximal tyrosine residues (bottom left) within the intracellular carboxy-terminal sequence that activate STAT1 and STAT3 and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade. The tyrosine residues included here relate to defined biological roles (position numbers are for the human gp130 sequence). Tyr759 (the mouse equivalent is Tyr757) is pivotal for docking of the tyrosine phosphatase SHP-2 and the cytokine receptor signaling inhibitor SOCS3. Both factors act as negative regulators of gp130-STAT signaling. In the context of infection, trauma and injury, sIL-6R is released from infiltrating neutrophils, monocytes and T cells, but IL-6 trans- signaling is antagonized by sgp130. The figure and its legend are taken from Hunter & Jones (251).

3-2 材料と方法

3-2-1 倫理的承認

全ての遺伝子組換え実験は、「信州大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則り、機関長の承認を受けて法令・指針等の申請に基づいた制限環境下にて行った（承認番号：13-005）。

3-2-2 菌株と培養条件

組換え遺伝子の発現宿主は *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (NZ9000; VS-ELS09000-01, MoBiTec GmbH, Goettingen, Germany) もしくは *Escherichia* (*E.*) *coli* M15 (276) (M15; 34210, QIAGEN K.K., Tokyo, Japan) を用いた。NZ9000 は 0.5% glucose (16805-35, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を含む M17 培地 (218561, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) (GM17) で培養した。必要に応じて、GM17 に chloramphenicol (08027-14, Nacalai Tesque, Inc.) (10 µg/mL) を添加した (GM17cm)。 *E. coli* JM109 (JM109; 9052, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) および MC1061 (MC1061; VS-ELS10610-01, MoBiTec GmbH) は、Luria-Bertani (LB) 培地 (1.10285.055, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で培養した。必要に応じて、LB 培地に chloramphenicol (25 µg/mL) もしくは ampicillin (02739-74, Nacalai Tesque, Inc.) (50 µg/mL) を添加した。6×ヒスチジン標識化 (His-tagged) GFP の遺伝子発現ベクター (pQE-30 Xa-GFP) を有する M15 (M15-GFP) は仲西が以前に構築したものをを用いた(277)。M15-GFP は ampicillin (50 µg/mL) および kanamycin (19839, Nacalai Tesque, Inc.) (20 µg/mL) を添加した LB 培地で培養した。寒天培地は、液体培地に 1.5%(w/v)の寒天(01162-15, Nacalai Tesque, Inc.) を添加し作成した。

3-2-3 遺伝子発現ベクターの構築

一般的な遺伝子工学技術は過去の知見に従った(210)。

IL6scFv をコードする遺伝子 (accession number: LC175907) は *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 のコドン使用頻度に最適化し合成した (Fig. 3-3)。遺伝子合成は Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) に委託し、合成遺伝子はプラスミド (pEX-A) を用いてクローニングした。納品されたプラスミドは *E. coli* JM109 を用いて増幅し、以後の実験に用いた。

IL6scFv 遺伝子の発現ベクターは、乳酸菌用プラスミド (pNZ8148#2:SEC (211), Fig. 3-4) を用いた。合成遺伝子および pNZ8148#2:SEC は制限酵素

(*KpnI*: 1068A, *HindIII*: 1060A, TaKaRa Bio Inc.) を用いて切断した (Table 3-1)。目的断片は 1% agarose (346-07831, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) ゲルを用いた電気泳動にて確認後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (FG-91202, NIPPON Genetics Co.Ltd, Tokyo, Japan) を用いて精製した。精製 DNA 断片は T4 DNA Ligase (M180A, Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いてライゲーション (Table 3-2) し、*E. coli* MC1061 へ導入した。LBcm 寒天培地上に得られたコロニーはプライマー (pNZ F3126: 5'-TGCCCCGTTAGTTGAAGAAG-3'/pNZ R340: 5'-TCA ATCAAAGCAACA CGTGC-3', Eurofins Genomics K.K.の受託サービスに合成を依頼した) を用いたコロニーPCR (Table 3-3) で解析した。コロニーを LBcm 液体培地に釣菌し、16 - 20 hr 振盪 (220 rpm) 培養後、FastGene Plasmid Mini Kit (FG-90402, NIPPON Genetics Co.Ltd) を用いてプラスミドを抽出した。精製プラスミドはプライマー (pNZ F3126, pNZ R340) を用いてシーケンス解析 (Eurofins Genomics K.K.に委託) に供した。結果は遺伝子解析ソフト (GENETYX-MAC Ver. 18.0.3, GENETYX, Tokyo, Japan) を用いて解析した。挿入遺伝子に変異・欠損のないことを確認し pNZ8148#2:SEC-IL6scFv (Fig. 3-4) の構築に成功した。

3-2-4 gmNZ9000 の構築

NZ9000 のコンピテントセルは MoBiTec GmbH の説明書通りに調製した。pNZ8148#2:SEC および pNZ8148#2:SEC-IL6scFv は、それぞれ電気穿孔法を用いて NZ9000 に導入した。すなわち、氷冷した 0.1 cm ギャップエレクトロポレーションキュベット (1652089, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) にコンピテントセル懸濁液 (40 μ L) およびプラスミド (100 - 500 ng) を加え、Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてパルス (2,000 V, 25 μ F, 200 Ω) した。キュベットに 500 μ L の氷冷 GM17 SOC 液体培地 (20 mM magnesium chloride (20935-05, Nacalai Tesque, Inc.), 2 mM calcium chloride (06730-15, Nacalai Tesque, Inc.) を含む GM17) を加え、氷上に 5 min 放置した。30°C で 2 hr 静置培養後、GM17cm 寒天培地に播き、さらに一晚培養した。得られたコロニーは GM17cm 液体培地に釣菌し、一晚培養後、終濃度が 20%(v/v) になるようグリセロール (09886-05, Nacalai Tesque, Inc.) を添加し、-80°C で保存した。

3-2-5 gmNZ9000 における組換え遺伝子の発現誘導

組換え遺伝子の発現誘導は、2 mL、50 mL もしくは 4 L 系で行った。30°C に

温めた GM17cm 液体培地に gmNZ9000 の一晚培養液を 5%(v/v)接種し、 $OD_{600} = 0.4$ になるまで静置培養した。nisin (VS-ELK01000-02, MoBiTec GmbH) を終濃度 0 - 12.5 ng/mL になるように培養液に加え、さらに 0 - 48 hr 静置培養した。培養終了後、 OD_{600} を測定した。

3-2-6 gmNZ9000 からの細胞抽出液および培養液上清画分の調製

3-2-6-1 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) /ウエスタンブロッティング用

3-2-5 の通り、2 mL 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心 ($8,000 \times g$, 4°C , 5 min) により細胞ペレットと培養液上清を分離した。細胞ペレットは 1 mL の TES (Table 3-4) に懸濁し、遠心 ($8,000 \times g$, 4°C , 5 min) することで洗浄した。得られた細胞ペレットは $70 \mu\text{L}/OD_{600} = 1$ の TES-L (5 mg/mL lysozyme chloride (20841-54, Nacalai Tesque, Inc.) および protease inhibitor cocktail (11836153001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含む TES) に再懸濁し、時々ノックをしながら 37°C , 30 min 放置した。放置後、 $30 \mu\text{L}/OD_{600} = 1$ の 20%(w/v) sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) を添加し、さらに $100 \mu\text{L}/OD_{600} = 1$ の 2 \times Laemmli sample buffer (196-11022, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を加えた。溶液を 95°C で 5 min 加温し、SDS 化した。培養液上清を 1,500 μL 回収し、氷冷した 100%(w/v) trichloroacetic acid (T4885, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を 300 μL 加えよく混和した。氷上に 3 hr 放置し、遠心 ($20,600 \times g$, 4°C , 15 min) により沈殿物を回収した。沈殿物を 400 μL の acetone (00310-95, Nacalai Tesque, Inc.) に懸濁し、遠心 ($20,600 \times g$, 4°C , 15 min) することで洗浄した。洗浄は他に 2 回繰り返した。得られた沈殿物を 50°C で完全に乾燥し、 $60 \mu\text{L}/OD_{600} = 1$ の TE (sucrose を含まない TES) に溶解した。等量の 2 \times Laemmli sample buffer を加え、室温で一晩放置することで SDS 化した。

3-2-6-2 精製用

3-2-5 の通り、4 L 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心 ($3,000 \times g$, 4°C , 20 min) により細胞ペレットを回収した。細胞ペレットは 800 mL の精製用 buffer (IMAC0, Table 3-5) に懸濁し、遠心 ($3,000 \times g$, 4°C , 20 min) することで洗浄した。洗浄は他に 1 回繰り返した。得られた細胞ペレットは -80°C で凍結し、菌体重量の 3 倍量の aluminum oxide (019-01975, Wako Pure

Chemical Industries, Ltd.) を用いて乳鉢上ですり潰した (on ice, 15 min)。菌体破砕物は、160 mL の ethylenediaminetetraacetic acid-free protease inhibitor cocktail (11836170001, Roche Diagnostics GmbH) を含む IMACO で回収した。遠心 ($15,000 \times g$, 4°C , 15 min) 後、可溶性画分を細胞抽出液として回収した。細胞抽出液はシリンジフィルター (pore size: $0.2 \mu\text{m}$; 17597-K, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) を用いて清澄化し、直ちに精製 (3-2-9 参照) に用いた。

3-2-6-3 ELISA 用

3-2-5 の通り、50 mL 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心 ($3,000 \times g$, 4°C , 20 min) により細胞ペレットを回収した。細胞ペレットは 10 mL の phosphate-buffered saline (PBS, Table 3-6) に懸濁し、遠心 ($3,000 \times g$, 4°C , 20 min) することで洗浄した。洗浄は他に 1 回繰り返した。得られた細胞ペレットは 3-2-6-2 と同様に乳鉢を用いて破砕した。菌体破砕物は、10 mL の protease inhibitor cocktail を含む PBS で回収した。遠心 ($15,000 \times g$, 4°C , 15 min) 後、可溶性画分を細胞抽出液として回収し、Pierce BCA Protein Assay Kit (23225, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) を用いてタンパク質濃度を測定した。

3-2-7 M15-GFP における組換えタンパク質の発現誘導と細胞抽出液の調製

M15-GFP における組換えタンパク質の発現誘導は、仲西の方法に従って実施した(277)。発現誘導終了後、仲西の方法に従って細胞抽出液を調製した(277)。得られた細胞抽出液は、溶媒を透析により IMACO に置き換え、直ちに精製 (3-2-9 参照) に用いた。

3-2-8 SDS-PAGE/ウェスタンブロッティング

3-2-6-1 および 3-2-9 で得たサンプルは、15%(v/v)ポリアクリルアミドゲル (Table 3-7) を用いた SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE には Running buffer (Table 3-8) を用い、定電流下 (10 mA) でサンプルを濃縮後、定電圧下 (200 V) でおよそ 50 min 泳動した。泳動終了後、一部のゲルを Coomassie Brilliant Blue R250 (00352, Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) を用いて染色し、バンドを観察した。他方で、未染色のゲルを用いて展開したバンドを PVDF 膜 (10600029, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に転写した。転写には Transfer buffer (Table 3-9) を用い、定電圧下 (100 V) で 1 hr 通電した。転写終了後、膜を 5%(w/v) skim milk (MORINAGA MILK INDUSTRY Co., LTD.,

Tokyo, Japan) を含む 0.05% (v/v) Tween20 (35624-15, Nacalai Tesque, Inc.) 含 tris-buffered saline (TBS-T, Table 3-10) に室温で 1 hr 浸すことでブロッキングした。適量の TBS-T を用いて膜を 3 回洗浄し、mouse anti-His-tag antibody (1/1000) (652501, BioLegend, San Diego, CA, USA) を含む TBS-T に 4°C で一晩浸した。適量の TBS-T を用いて膜を 3 回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1/5000) (A4416, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を含む TBS-T に室温で 1 hr 浸した。発色基質は ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (RPN2232, GE Healthcare) を用い、バンドは ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いて検出した。ImageJ (278) を用いたデンシトメトリーにて、検出したバンドを定量した。

3-2-9 His-tagged タンパク質の精製

His-Trap HP カラム (17524701, GE Healthcare) を用いた固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィーの手法にて、細胞抽出液より His-tagged タンパク質を精製した。クロマトグラフィーは fast protein liquid chromatography system (AKTA pure 25, GE Healthcare) を用いて実施した。3-2-6-2 および 3-2-7 で得られた細胞抽出液は、Superloop (18111382, GE Healthcare) を用いて、IMAC0 で平衡化したカラムにロードした。10 column volumes (CV) の 20 mM imidazole (19028-22, Nacalai Tesque, Inc.) を含む IMAC0 を用いてカラムを洗浄した。カラムに結合したタンパク質は、リニアグラジエント溶出 (imidazole 濃度: 20 - 500 mM, 30 CV) の手順で溶出した。すべての手順において、流速は 1 mL/min で実施した。得られた各画分 (精製前、フロースルー、洗浄および溶出) は、3-2-8 の通り SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングを用いて解析した。rGFP を含む溶出画分は、滅菌水を用いて一晩透析し、凍結乾燥にて濃縮した。精製 rGFP の抗 His-tag 抗体に対する反応性は、ウエスタンブロッティング (3-2-8 参照) および ELISA (3-2-10 参照) にて検証した。rIL6scFv を含む溶出画分は、PBS を用いて一晩透析し、限外濾過膜 (4305, Merck Millipore Ltd. Co. Cork, Ireland) を用いて濃縮した。濃縮液中の rIL6scFv 濃度は、精製 rGFP をスタンダードタンパク質とするウエスタンブロッティング (3-2-8 参照) により決定した。

3-2-10 ELISA

His-tagged タンパク質を検出するために、一般的な ELISA の手法を用いた (279)。

3-2-10-1 His-tagged タンパク質の抗 His-tag 抗体に対する反応性の検討

3-2-6-3 で調製した細胞抽出液 (20 µg/100 µL) もしくは 3-2-9 で精製した rGFP (various amounts/100 µL) を 96-well immuno-plate (442404, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) に播き、4°Cで一晩放置することで固相化した。各 well を 0.05 % Tween20 (35624-15, Nacalai Tesque, Inc.) を含む PBS (PBS-T) で 3 回洗浄した。各 well に 3 % bovine serum albumin (010-15153, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を含む PBS-T (Blocker) を播き (200 µL)、室温で 2 hr 放置することでブロッキングした。PBS-T を用いて各 well を 3 回洗浄後、Blocker で 1,000 倍希釈した mouse anti-His-tag antibody (652501, BioLegend) を播き (100 µL)、室温で 2 hr 放置した。PBS-T を用いて各 well を 5 回洗浄後、Blocker で 5,000 倍希釈した HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (A4416, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を播き (100 µL)、室温で 1 hr 放置した。PBS-T を用いて各 well を 7 回洗浄後、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (05298-80, Nacalai Tesque, Inc.) を播き (100 µL)、室温で 15 min 放置した。酵素反応は 2 N sulfuric acid (100 µL) (95626-06, Nacalai Tesque, Inc.) を用いて停止し、iMark Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて波長 450 nm の吸光度を測定した。

3-2-10-2 rIL6scFv の mL-6 に対する結合性の検討

96-well immuno-plate (442404, Nunc A/S) に 1 ng/mL rIL-6 (406-ML, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を播き (100 µL)、4°Cで一晩放置することで固相化した。PBS-T を用いて各 well を 3 回洗浄後、Blocker を播き (200 µL)、室温で 2 hr 放置することでブロッキングした。PBS-T を用いて各 well を 3 回洗浄後、3-2-6-3 で調製した細胞抽出液 (200 µg/100 µL) もしくは 3-2-9 で精製した組換えタンパク質 (various amounts/100 µL) を播き、室温で 2 hr 放置した。PBS-T を用いて各 well を 5 回洗浄後、3-2-10-1 と同様に、抗 His-tag 抗体を用いて His-tagged タンパク質を検出した。

3-2-11 統計解析

すべての統計解析は、統計解析ソフトウェア (ystat2004.xls, Igakutosho Shuppan, Tokyo, Japan) を用いて実施した。群間の統計学的有意差は、Student's t test もしくは一元配置分散分析に引き続く Dunnett's test を用いて検出した。有意水準 α は 0.05 を用いた。

CAGGTCCAATTGAAAGAATCAGGGCCTGGATTAGTCCCTTCACAATCATTGAGTATTACATGTACTGTTAGT
GACTTTAGCTTAACCAATTATGGTGTTTCATTGGGTTTCGTCAATCACCAGGTAAAGGCTTAGAATGGTTAGGA
GTTATTTGGTCTGGTGGGTCAACAGACTATAATGCAGCTTTTCATTTACGTCTTTCTATTAGCAAAGATAAC
TCTAAATCTCAAGTGTTCTTTGAGATGAACTCATTGCAAGCTGATGATACTGCCATCTATTACTGTGCAAGA
AATGGTAATCGATATTACGGATATGCGTTAGATTATTGGGGTCAAGGGACTTCTGTTACAGTCTCATCTGGT
GGTGGCGGAAGTGGTGGTGGTGGTTCAGGAGGTGGAGGATCTGATGTAGTGATGACACAACTCCCTTATCA
TTACCTGTATCTTTAGGCGATCAAGCAAGCATTTCTTGTCGTAGTTCACAAAGTATTGTTACAGTAATGGG
AATACGTATTTAGAATGGTATCTTCAGAAACCAGGCCAATCACCGAAACTCTTGATCTATACCGTTTCTAAT
CGTCTTTCAGGAGTACCAGATCGCTTTTCAGGGAGTGGTTCAGGCACTGACTTTTACACTTAAGATATCAAGA
GTAGAAGCTGAAGATCTTGGAGTTTACTATTGCTTTCAAGGAAGTCATGGACCATATACGTTTGGAGGAGGA
ACAAAACTCGAAATTAAGCTGCAGACCTGCGGCCGC

Fig. 3-3 A DNA sequence coding for IL6scFv (accession number: LC175907) was synthesized upon codon optimization for *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363.

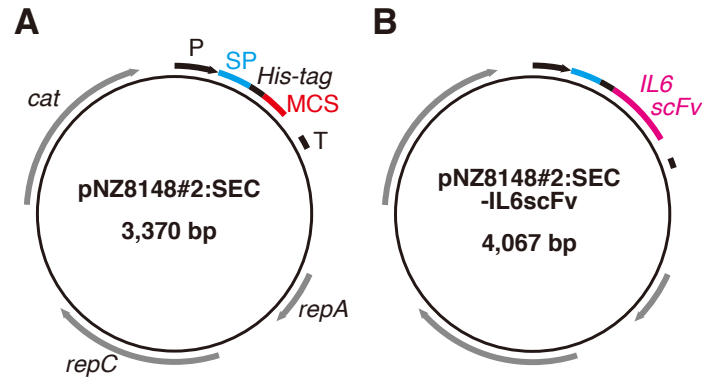


Fig. 3-4 Schematic representations of lactococcal gene expression vectors. A lactococcal secretion plasmid, pNZ8148#2:SEC (A), was integrated a DNA fragment coding for IL6scFv gene in MCS to construct an IL6scFv-secretion vector, pNZ8148#2:SEC-IL6scFv (B). *P*: nisin A promoter, *SP*: sequence of the signal peptide from the USP45 protein, *His-tag*: hexahistidine tag, *MCS*: multiple cloning site, *T*: terminator, *rep*: replication gene, *cat*: chloramphenicol acetyltransferase gene. The figure is taken from Shigemori et al (229).

Table 3-1 Reaction solution and conditions for restriction enzymatic reaction.

Component of reaction solution	
10× M buffer (TaKaRa Bio Inc.)	2 µL
DNA	1 ng
<i>Kpn</i> I (1068A, TaKaRa Bio Inc.)	1 µL
<i>Hind</i> III (1060A, TaKaRa Bio Inc.)	1 µL
Ultrapure water	up to 20 µL
Condition for reaction	
37 °C	overnight
75 °C	15 min

Table 3-2 Reaction solution and conditions for ligation.

Component of reaction solution	
10× buffer (Promega Corporation)	2 µL
DNA	8 µL
T4 DNA Ligase (M180A, Promega Corporation)	1 µL
Condition for reaction	
4 °C	overnight

Table 3-3 Reaction solution and conditions for colony-direct PCR.

Component of reaction solution	
EmeraldAmp PCR Master Mix (RR300A, TaKaRa Bio Inc.)	5 µL
Primer mixture (pNZ F3126/pNZ R340, 10 µM each)	0.5 µL
Ultrapure water	4.5 µL
Colony	trace
Condition for reaction	
95 °C	5 min
95 °C	30 sec
60 °C	30 sec
72 °C	1 min
40 cycles	
4 °C	soak

Table 3-4 Composition of TES.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	10 mM
Ethylenediaminetetraacetic acid (14347-21, Nacalai Tesque, Inc.)	1 mM
Sucrose (30404-45, Nacalai Tesque, Inc.)	25 %
<i>in distilled water</i>	
pH 8.0	

Table 3-5 Composition of IMAC0.

Sodium phosphate (31801-05, Nacalai Tesque, Inc.)	20 mM
Sodium chloride (09649-15, Nacalai Tesque, Inc.)	500 mM
<i>in distilled water</i>	
pH 8.0	

Table 3-6 Composition of PBS.

Disodium phosphate (31801-05, Nacalai Tesque, Inc.)	10 mM
Monopotassium phosphate (28721-55, Nacalai Tesque, Inc.)	1.8 mM
Potassium chloride (28538-75, Nacalai Tesque, Inc.)	2.7 mM
Sodium chloride (09649-15, Nacalai Tesque, Inc.)	137 mM
<i>in distilled water</i>	
pH 7.4	

Table 3-7 Composition of polyacrylamide gel.

Component of running gel	
30%(w/v) acrylamide (018-25625, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	4,000 μ L
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,000 μ L
10% sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	80 μ L
10% ammonium persulfate (A3678, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	27 μ L
Tetramethylethylenediamine (205-06313, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	4 μ L
Distilled water	1,920 μ L
Component of stacking gel	
30%(w/v) acrylamide (018-25625, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	400 μ L
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	625 μ L
10% sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	25 μ L
10% ammonium persulfate (A3678, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	8.3 μ L
Tetramethylethylenediamine (205-06313, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	2.5 μ L
Distilled water	1,440 μ L

Table 3-8 Composition of Running buffer.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Glycine (17109-35, Nacalai Tesque, Inc.)	14.4 g
Sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	1 g
Distilled water	up to 1 L

Table 3-9 Composition of Transfer buffer.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Glycine (17109-35, Nacalai Tesque, Inc.)	14.4 g
Methanol (21914-03, Nacalai Tesque, Inc.)	100 mL
Distilled water	up to 1 L

Table 3-10 Composition of TBS-T

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Potassium chloride (28538-75, Nacalai Tesque, Inc.)	0.2 g
Sodium chloride (09649-15, Nacalai Tesque, Inc.)	8 g
Tween20 (35624-15, Nacalai Tesque, Inc.)	0.5 mL
Distilled water	up to 1 L

pH 7.4

3-3 結果

3-3-1 NZ-IL6scFv はナイシン刺激依存的に rIL6scFv を産生・分泌する

ウエスタンブロッティングにおいて、ナイシン添加培地で培養した NZ-IL6scFv 由来の細胞抽出液より rIL6scFv の分泌前駆体 (34.0 kDa) および分泌型 rIL6scFv (31.2 kDa) の分子量に一致するバンドを観察した (Fig. 3-5 B)。また、同培養液由来の培養液上清画分からは、分泌型 rIL6scFv に一致するシングルバンドを検出した (Fig. 3-5 D)。一方で、ナイシン添加培地で培養した NZ-VC およびナイシン無添加培地で培養した 2 種の gmNZ9000 の細胞抽出液および培養液上清画分からは、rIL6scFv に一致するバンドは検出されなかった (Fig. 3-5 B,D)。CBB 染色では、いずれのサンプルからも rIL6scFv のバンドを同定することはできなかった (Fig. 3-5 A,C)。

3-3-2 NZ-IL6scFv における rIL6scFv の最適分泌条件の決定

NZ-IL6scFv における rIL6scFv の最適分泌条件を決定するために、組換え遺伝子の発現誘導剤として用いるナイシンの添加濃度と、ナイシン添加後の培養時間について検討した。様々な濃度のナイシン (終濃度 0 - 12.5 ng/mL) を添加後、3 hr インキュベートした培養液の OD₆₀₀ は、ナイシン添加濃度依存的に減少した (Fig. 3-6 A)。とくに、ナイシン無添加培養液と比較して、0.78 ng/mL 以上のナイシンを添加した培養液において、顕著な細胞増殖の阻害が観察された (Fig. 3-6 A)。一方で、細胞および培養液上清における rIL6scFv の産生量は、ナイシン添加濃度依存的に増加した (Fig. 3-6 B)。しかし、1.56 ng/mL 以上のナイシンを用いて誘導した NZ-IL6scFv の培養液上清において、rIL6scFv の分泌前駆体のバンドを確認した (Fig. 3-6 B, Sup)。1 ng/mL ナイシンを添加後の培養液 OD₆₀₀ は、7 hr まで時間依存的に増加した (Fig. 3-6 C)。7 hr 以降は、OD₆₀₀ = 2.0 ~ 2.5 に安定した (Fig. 3-6 C)。細胞における rIL6scFv は、ナイシン刺激後 1 hr で高発現し、8 hr 以降では漸減した (Fig. 3-6 D, Cell)。一方で、培養液上清における分泌型 rIL6scFv の産生量は時間依存的に増加し、12 hr 以降では rIL6scFv の分泌前駆体のバンドも確認された (Fig. 3-6 D, Sup)。

3-3-3 抗 His-tag 抗体に反応性を有する rGFP の精製

rIL6scFv に対するコントロールタンパク質を得るために、M15-GFP より His-tagged rGFP を精製した (Fig. 3-7 A)。精製過程における溶出画分から高純度の rGFP を得た (> 99%) (Fig. 3-7 A)。ELISA およびウエスタンブロッティングを用いて、精製 rGFP の抗 His-tag 抗体に対する反応性を検討した (Fig. 3-7

B,C)。いずれの解析においても、rGFP 量と抗 His-tag 抗体の反応性の間に高い相関が見られた (Fig. 3-7 B,C)。以上の結果から、精製 rGFP は His-tagged コントロールタンパク質として利用可能であることが示された。

3-3-4 NZ-IL6scFv からの rIL6scFv の精製

His-Trap HP カラムを用いて、ナイシン誘導した NZ-IL6scFv の細胞抽出液より rIL6scFv を精製した。精製過程で得られた溶出液は 3 つに分画し (Fig. 3-8 A)、精製度の最も高い F-3 を以後の試験に用いた (Fig. 3-8 B)。F-3 は限外濾過にて濃縮後、rGFP をコントロールタンパク質とするウエスタンブロッティングに供し、同濃縮液の rIL6scFv 濃度を 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と決定した (Fig. 3-8 C)。

3-3-5 NZ-IL6scFv が産生する rIL6scFv は rmlL-6 に対して免疫活性を有する

rIL6scFv の rmlL-6 に対する免疫活性は、Fig. 3-9 A の通り ELISA を用いて検討した。本システムに精製 rIL6scFv を適応すると、タンパク質濃度依存的に A_{450} 値が上昇した (Fig. 3-9 B)。一方で、精製 rGFP を適応した時の A_{450} 値は、測定したすべての濃度においてベースラインだった (Fig. 3-9 B)。続いて、gmNZ9000 由来の細胞抽出液を His-tagged タンパク質の供給源として用い、rIL6scFv の免疫活性を検討した (Fig. 3-10)。NZ-VC および NZ-IL6scFv においてナイシン刺激により産生した His-tagged タンパク質は、抗 His-tag 抗体に反応性を有することを確かめた (Fig. 3-10 A)。これら His-tagged タンパク質の内、rIL6scFv のみが rmlL-6 に反応性を有することが明らかになった (Fig. 3-10 B)。以上の結果から、NZ-IL6scFv の産生する rIL6scFv は rmlL-6 に対して免疫活性を有することが示された。

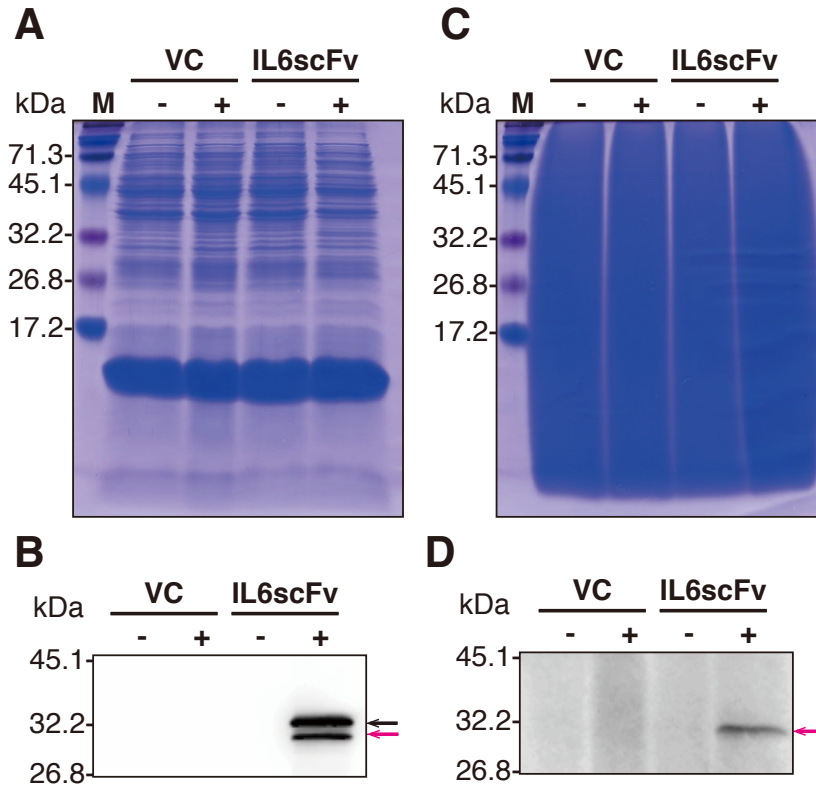


Fig. 3-5 Detection of rIL6scFv. Gene expression was induced in NZ-VC (VC) and NZ-IL6scFv (IL6scFv) with (+) or without (-) nisin. Cellular extracts (A, B) and culture supernatants (C, D) were analyzed with SDS-PAGE (A, C) or western blotting using an anti-His tag Ab (B, D). The *black* and *pink* arrows indicate the secretion precursor of rIL6scFv (34.0 kDa) and the secretion form of rIL6scFv (31.2 kDa), respectively. *M*: molecular weight marker. The figure is taken from Shigemori et al (229).

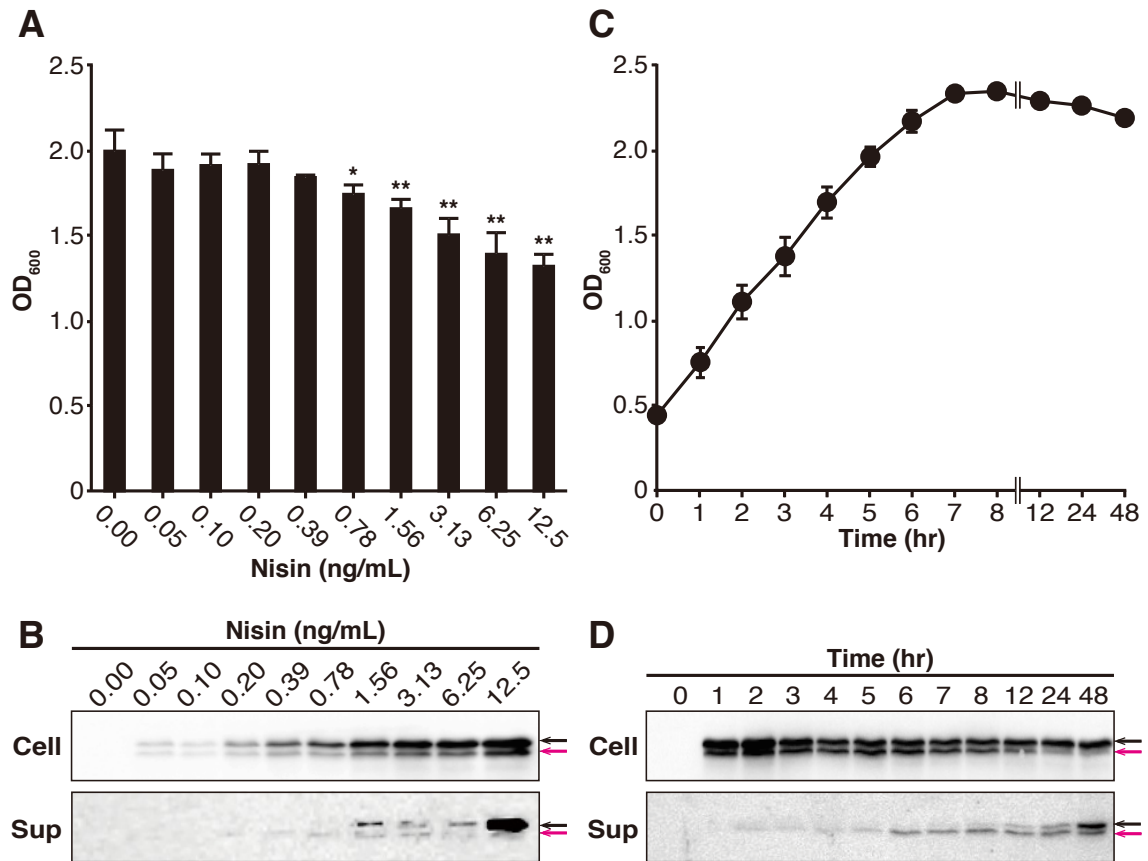


Fig. 3-6 Optimization of the conditions for rIL6scFv secretion in NZ-IL6scFv. (A, B) NZ-IL6scFv was cultured with various concentrations of nisin (0 to 12.5 ng/mL). (A) After 3 hr incubation at 30°C, an OD₆₀₀ in each culture was measured. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. 0 ng/mL nisin. (B) Cellular extracts (Cell) and culture supernatants (Sup) were prepared from each culture, and analyzed with western blotting using an anti-His tag Ab. (C, D) NZ-IL6scFv was cultured with 1 ng/mL nisin for 0 to 48 hr. (C) An OD₆₀₀ in the culture was measured at indicated time points. (D) Cellular extracts (Cell) and culture supernatants (Sup) were prepared from indicated time points, and analyzed with western blotting using an anti-His tag Ab. (A, C) Data are the mean ± SD from three independent experiments. (B, D) *Black* and *pink* arrows indicate the secretion precursor of rIL6scFv (34.0 kDa) and the secretion form of rIL6scFv (31.2 kDa), respectively. Similar results were obtained from three independent experiments, and representative data are shown. The figure is taken from Shigemori et al (229).

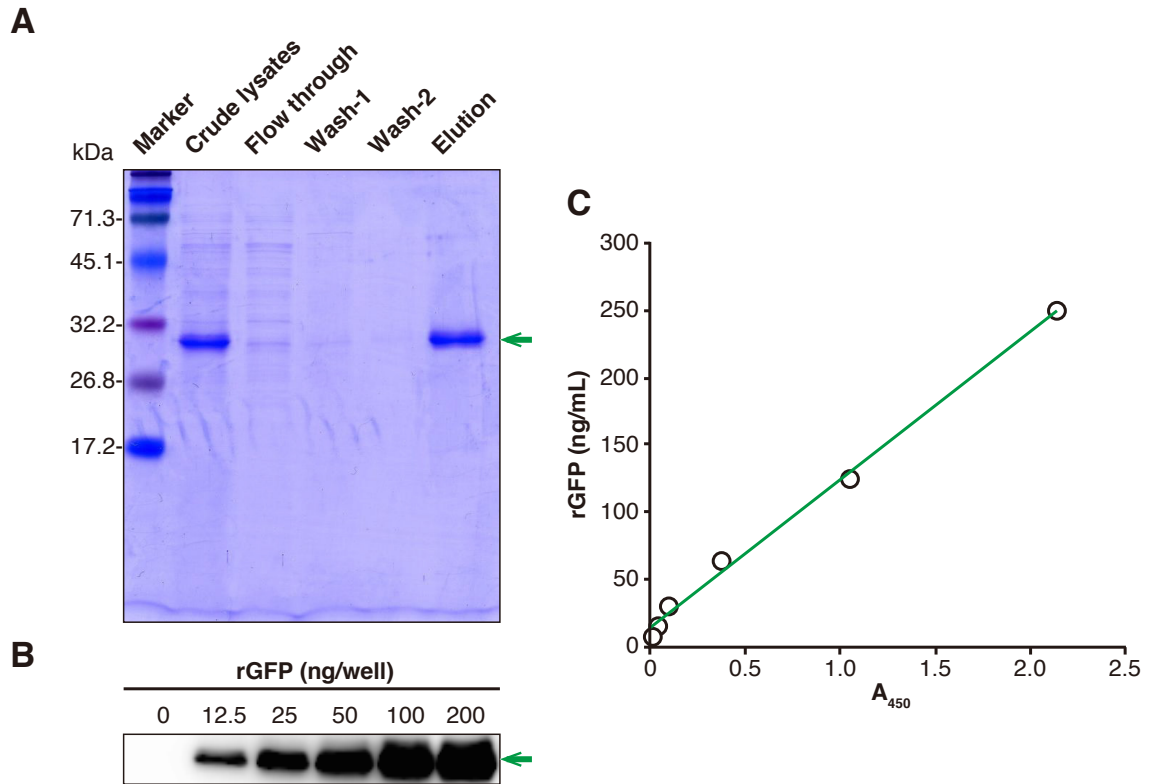


Fig. 3-7 Purification and characterization of rGFP expressed by M15-GFP. His-tagged rGFP was expressed in M15-GFP, and purified from crude lysates of the M15-GFP cells by immobilized metal ion affinity chromatography. (A) Fractions obtained from the purification procedure were analyzed by SDS-PAGE. (B, C) Different amount of purified rGFP was subjected to western blotting (B) and ELISA (C) with an anti-His tag Ab. Similar results were obtained from three independent experiments, and representative data are shown. (A, B) *Green allows* indicate rGFP (30.7 kDa).

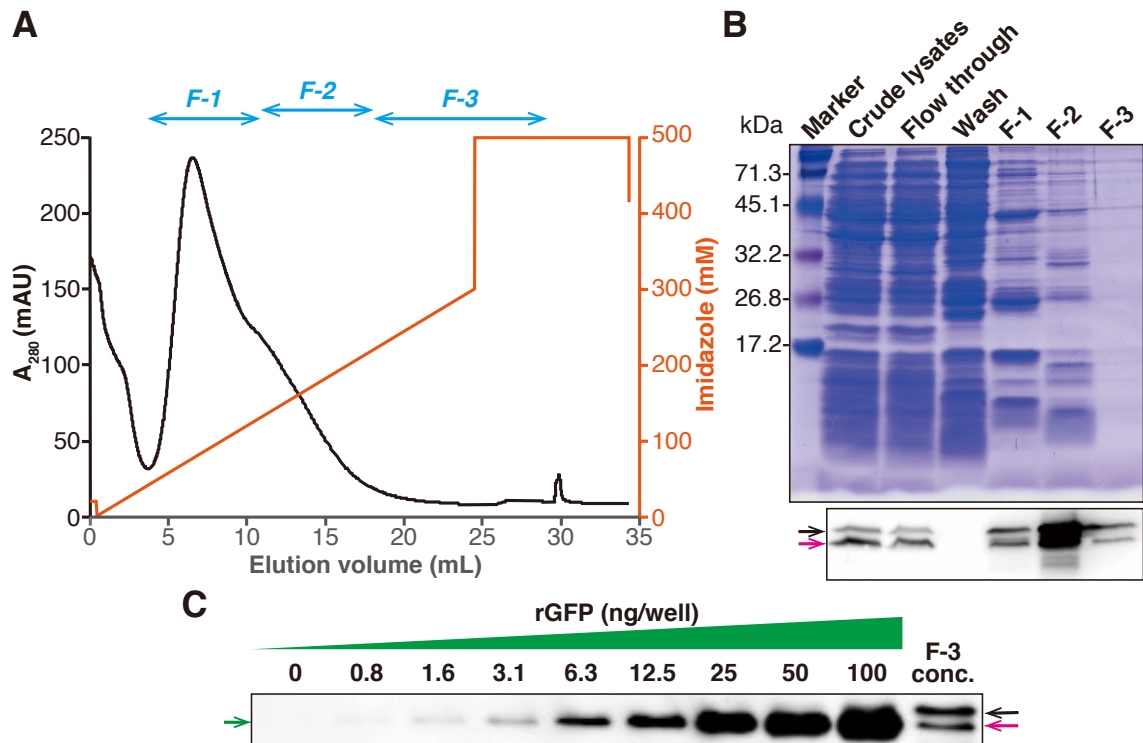


Fig. 3-8 Purification of rIL6scFv. rIL6scFv was purified from cellular extracts prepared from nisin-induced NZ-IL6scFv by an immobilized metal ion affinity chromatography technique. (A) A chromatogram in the elution phase in the chromatography. The eluent was collected in three fractions (F-1 to F-3). (B) Fractions obtained from the chromatography were analyzed with SDS-PAGE (*upper*) and western blotting using an anti-His tag Ab (*lower*). (C) rIL6scFv concentration in the F-3 concentrate was determined by western blotting with an anti-His tag Ab. Various amounts of rGFP purified from M15-GFP were used as a standard protein. Ten microliters of a two-fold-diluted F-3 concentrate was applied to SDS-PAGE. Densitometric analysis was performed to draw a standard curve, from which the rIL6scFv concentration in the F-3 concentrate was determined as 3 $\mu\text{g/mL}$. (B, C) *Black*, *pink*, and *green* arrows indicate the secretion precursor of rIL6scFv (34.0 kDa), the secreted form of rIL6scFv (31.2 kDa), and rGFP (30.7 kDa), respectively. The part of the figure (A, B) is taken from Shigemori et al (229).

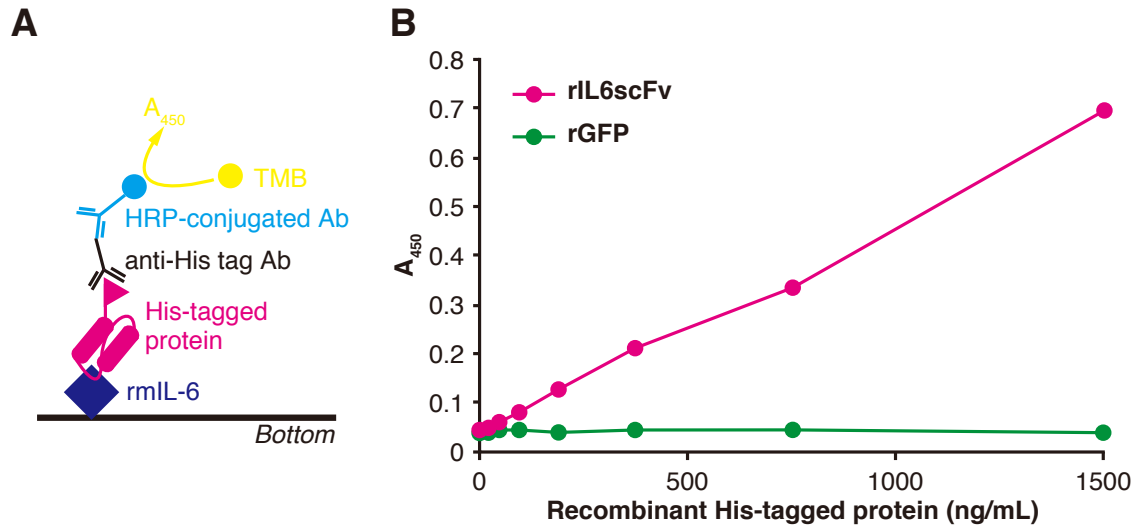


Fig. 3-9 Immunoreactivity assays of rIL6scFv. (A) A schematic representation of the assay based on an ELISA technique. A solid phase-immobilized rmlL-6 was reacted with the His-tagged proteins. The rmlL-6-binding proteins were then detected with an anti-His tag Ab. (B) Different concentrations of purified rIL6scFv (*pink*) and rGFP (*green*) were applied to the ELISA system to determine their rmlL-6 reactivity. Similar results were obtained from two or three independent experiments, and representative data are shown. The figure is taken from Shigemori et al (229).

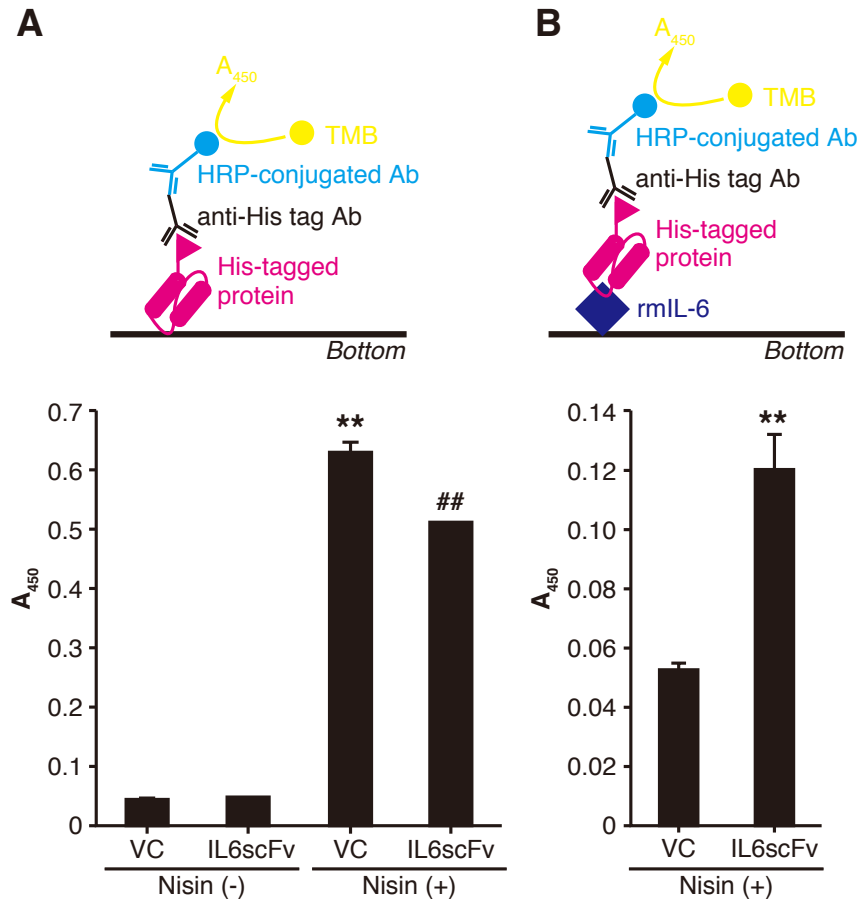


Fig. 3-10 (A) The reactivity of cellular extracts from gmNZ9000 strains with anti-His tag antibody was examined by ELISA. Cellular extracts (20 μ g of protein) from nisin-non-induced (-) or nisin-induced (+) gmNZ9000 strains were immobilized on ELISA plates, and were further detected with anti-His tag antibody. ** and ## mean significant differences versus VC (-) or IL6scFv (-), respectively ($P < 0.01$). (B) A solid phase-immobilized rmlL-6 was reacted with the cellular extracts (200 μ g of protein) from nisin-induced (+) gmNZ9000 strains that were used as a source of His-tagged protein. The rmlL-6-binding proteins were then detected with an anti-His tag Ab. ** $P < 0.01$. (A, B) Similar results were obtained from two or three independent experiments, and representative data are shown. The part of the figure (B) is taken from Shigemori et al (229).

3-4 考察

gmLAB は、scFv の産生プラットフォームとして高い適合性を有していると言える。第一に、乳酸菌における遺伝子組換え技術の発達から、組換えタンパク質の効率的な産生システムが数多く存在する。とくに、*L. lactis* における nisin-controlled gene expression (NICE) system は、最も効率的な遺伝子発現システムのひとつとして頻繁に用いられている(13)。第二に、gmLAB は組換えタンパク質の粘膜運搬媒体として生体に直接投与することが可能であり（組換えタンパク質の精製が不要）、従来の抗体医薬と比較して、製造コストを大幅に低減できる可能性がある。これまで、いくつかの研究において、scFv を産生する gmLAB の構築が報告され、モデル動物を用いた前臨床研究にて疾患の予防・軽減効果が検討されてきた(143, 146, 147, 280)。例えば、Kruger et al は、*Streptococcus mutans* の streptococcal antigen I/II adhesin molecule に対する scFv を産生する gmLAB (*Lactobacillus zeae*) を構築し、同 gmLAB の経口投与はウサギにおけるう蝕を軽減することを示した(143)。しかし、抗サイトカイン scFv を産生する gmLAB の構築はこれまで報告が無く、その利用価値も見出されていない。

本研究は、NICE system を基盤として、抗 IL-6 scFv 抗体を分泌する gm-*L. lactis* の構築に取り組んだ。結果として、ナイシン刺激依存的に rIL6scFv を産生・分泌する gm-*L. lactis* (NZ-IL6scFv) の構築に成功した。続いて、rIL6scFv の産生・分泌効率の向上を目的に、組換えタンパク質の発現誘導条件を検討した。rIL6scFv の発現・分泌量は、組換え遺伝子の発現誘導剤として用いるナイシンの添加濃度依存的に増加した。一方で、1.56 ng/mL 以上のナイシン存在下では、細胞の分泌機構を介さない細胞内タンパク質 (rIL6scFv の分泌前駆体) の漏出が観察された。ナイシンは、一部の *L. lactis* が産生する抗菌性ペプチド（バクテリオシン）であり、細胞膜の孔形成や細胞壁の合成阻害を介してその抗菌性を発揮する(30, 281)。ナイシン添加濃度依存的に NZ-IL6scFv の増殖が阻害されたことを加味して、rIL6scFv 分泌前駆体の培養液上清への漏出は、高濃度のナイシンによる細胞の障害が原因であることが考えられた。以上の結果から、rIL6scFv 分泌における最適ナイシン濃度は 1 ng/mL と決定した。1 ng/mL のナイシン存在下において、NZ-IL6scFv は 7 hr まで増殖し、伴って、rIL6scFv の分泌量が増加した。一方で、8 hr 以降は定常期/死滅期に入り、細胞内における rIL6scFv の産生量は漸減した。また、12 hr 以降の培養液上清において rIL6scFv の分泌前駆体が検出され、溶菌による受動的な漏出が示唆された。従って、rIL6scFv 分泌における最適誘導時間を対数増殖期後期の 6 - 7 hr に決定した。

抗体と比較して小さな分子である scFv は、組織への高い浸透性や低い免疫原性等の臨床応用において好ましい性質を有している(282)。従って、抗体として完

全な活性を有する scFv は、抗体医療における代替薬としての利用が期待されている。そこで本研究は、rIL6scFv の抗体としての免疫活性を、ELISA を用いて検討した。本 ELISA システムにおいて、rIL6scFv は rmlL-6 に結合し、抗 His-tag 抗体に検出されることが明らかになった。一方で、コントロールタンパク質として用いた rGFP および NZ-VC 由来の His-tagged タンパク質は rmlL-6 への結合は観察されなかった。すなわち、NZ-IL6scFv が産生する rIL6scFv は、抗マウス IL-6 抗体としての免疫活性を有することが証明された。

IL-6 シグナリングは、粘膜における慢性炎症疾患、自己免疫疾患およびガンの病理形成において重要な役割を担っていると考えられている(251, 283-285)。例えば、IL-6 は炎症性腸疾患において、T 細胞の分化や活性化、増殖を調節することで、消化管粘膜における炎症を助長することが知られている(284)。喘息患者では、mixed eosinophilic-neutrophilic bronchitis の増悪を介して肺機能を障害することが報告された(273)。他にも、IL-6 依存的な STAT3 の活性化はガン細胞の増殖と生存を促進することから、腫瘍の発生に関連付けられている(285)。重要なことに、IL-6 シグナリングのブロッキング抗体の投与は、これら疾患のモデル動物において治療効果を発揮することが報告されている(271, 273, 286, 287)。これらの事実から、NZ-IL6scFv を用いた rIL6scFv の粘膜標的化は、粘膜における慢性炎症やガンの予防・軽減において効果的な戦略になるかもしれない。

まとめると、本研究は rIL6scFv を産生・分泌する gm-*L. lactis* (NZ-IL6scFv) の構築に成功した。また、NZ-IL6scFv における rIL6scFv の最適分泌条件を決定した。重要なことに、rIL6scFv の抗マウス IL-6 抗体としての免疫活性を証明した。本研究は、gmLAB における抗サイトカイン scFv の産生・分泌を示した世界初の成果となった。NZ-IL6scFv は rIL6scFv の効率的な産生体および粘膜運搬媒体の研究開発において魅力的なツールになるかもしれない。本研究成果が安価な抗体医薬の実現に向けた基礎的知見になることを願っている。

第四章

ウシ β ラクトグロブリンを分泌する *Lactococcus lactis*

組換え体の構築と組換えタンパク質の生理活性の検討

4-1 緒言

β ラクトグロブリン (BLG) は、ウシをはじめとする反芻動物および幾つかの非反芻動物 (ブタ、ウマ、イルカ、ネコ等) の乳に含まれるタンパク質である(288, 289)。しかし、BLG はヒトの乳には全くもしくはごく微量にしか存在しないことが報告されている。反芻動物の乳において、BLG は主要なホエイタンパク質である。例えば、牛乳において、BLG はホエイタンパク質の約 50%、総タンパク質の 7 ~ 12 %を占める (2 ~ 4 g/L) (290)。BLG は、162 アミノ酸残基から成る比較的小さな球状タンパク質で、分子質量はおおよそ 18 kDa である(290)。BLG は pH の変化により単量体もしくは多量体を形成する性質を持つ。すなわち、pH 3.7 ~ 5.1 では二量体から八量体、pH 5.1 ~ 6.5 では二量体を形成するが、pH 3.5 以下および pH 7.0 以上では単量体に解離する(291)。現在に至るまで、BLG の生理的存在意義は明確にされていない。しかし、BLG の 3 次構造は、レチノール結合タンパク質やビリリン結合タンパク質、ヘモシアニン結合タンパク質と高い相同性を有することから、疎水性小分子の輸送や蓄積の役割を担っていると考えられている(292)。

これまで、BLG やそれに由来するペプチドは異なる生理活性を発揮することが報告されている。例えば、BLG は牛乳アレルギーの主要な原因物質 (アレルゲン) であり、同疾患の根本治療を目的とした減感作療法における治療タンパク質としての利用が期待されている(293, 294)。一方で、酵素分解により生じた BLG 由来ペプチドは、降圧作用、抗酸化作用、抗菌作用、抗糖尿病作、鎮痛作用など、多彩な生体調節作用を発揮することが報告されている (Table 4-1) (288, 295)。とくに、ペプシンやトリプシンといった消化酵素の分解により生じた BLG ペプチドは、dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) の活性を阻害することが報告されており、2 型糖尿病治療の代替物として期待されている(296-300)。DPP-IV (別名 CD26) は、生体内に恒常的に存在するセリンプロテアーゼであり、インクレチンを基質とする(301)。インクレチンは、食餌刺激などに反応した腸管上皮の L 細胞もしくは K 細胞が分泌する消化管ホルモンであり、主に glucose-dependent insulintropic polypeptide と glucagon-like peptide-1 から成る。インクレチンは、膵臓に作用点を持ち、 β 細胞によるインスリン分泌を促進し、 α 細胞によるグルカゴン産生を抑制する(302)。すなわち、DPP-IV 阻害剤は、インクレチンの保護を介して生体の糖代謝を改善することが期待される。実際に、ビルダグリプチン、サキサグリプチン、アログリプチン、リナグリプチンといった DPP-IV 阻害薬は、2 型糖尿病の治療薬として臨床応用されている。

これまでに、BLG を産生する乳酸菌組換え体 (genetically modified lactic acid bacteria: gmLAB) の粘膜 (経口もしくは経鼻) 投与は、牛乳アレルギーモ

デル（BLG 感作マウス）におけるアレルギー反応を予防・軽減することが示されている(126, 127, 130, 132, 303)。すなわち、gmLAB を用いた BLG の粘膜デリバリーは、牛乳アレルギーの予防や治療に向けた新アイディアとして注目されている。しかし、gmLAB が産生する BLG について、生体調節機能に関する報告は存在しない。そこで本研究は、ウシ BLG (bBLG) を分泌する gm-*Lactococcus* (*L.*) *lactis* (NZ-BLG) を構築し、組換え bBLG (rBLG) とその酵素分解物の生理活性（アレルギー性および DPP-IV 阻害活性）を検討することを目的とした。

Table 4-1 Bioactive peptides derived from BLG (288, 295).

Fragment	Sequence	Enzyme	Activity	Ref.
f(145-149)	MHIRL	Corolase PP	Antioxidant	(304)
f(42-46)	YVEEL			
f(19-29)	WYSLAMAASDI			
f(151-155)	FNPTQ	Thermolysin	Antioxidant	(305)
f(58-61)	LQKW			
f(95-101)	LDTDYKK			
f(15-20)	VAGTWY	Trypsin		(306)
f(19-22)	WYSL	Alcalase		(307)
f(9-14)	GLDIQK	Pepsin and trypsin	Anti-hypertensive (Inhibition of angiotensin I- converting enzyme)	(308)
f(15-20)	VAGTWY			(306)
f(71-75)	IIAEK			
f(78-83)	IPAVFK	Proteinase K		(309)
f(78-80)	IPA			
f(102-105)	YLLF	Synthetic		(310)
f(146-149)	HIRL			
f(142-148)	ALPMHIR	Trypsin		(311)
f(106-111)	CMENSA	Pepsin, then trypsin and chymotrypsin	Anti-hypertensive (Inhibition of angiotensin I- converting enzyme)	(312)
f(142-146)	ALPMH			
f(94-100)	VLDTDYK			
f(15-19)	VAGTW	Trypsin		
f(81-83)	VFK			
f(22-25)	LAMA			
f(32-40)	LDAQSAPLR	Protease preparation from <i>Cynara cardunculus</i>		(313, 314)
f(33-42)	DAQSAPLRVY			
f(148-153)	RLSFNP	Crude proteinases from <i>Lactobacillus helveticus</i> LB10		(315)

f(84-91)	IDALNENK	Commercial preparation from bovine pancreas		(316)
f(125-135)	TPEVDDEALEK	(trypsin + chymotrypsin)		
f(14-18)	KVAGT			
f(123-125)	VRT			
f(147-149)	IRL	Porcine pepsin	Antimicrobial	(317)
f(50-54)	PEGDL			
f(143-146)	LPMH			
f(134-136)	EKF			
f(15-20)	VAGTWY			
f(25-40)	AASDISLLDAQSAPLR	Bovine trypsin		(318)
f(78-83)	IPAVFK			
f(92-100)	VLVLDTDYK			
f(78-80)	IPA	In silico		(319)
f(15-20)	VAGTWY			(300, 306)
f(78-82)	IPAVF	Trypsin	Antidiabetic	(299)
f(78-83)	IPAVFK		(Inhibition of	(299,
f(125-135)	TPEVDDEALEK		dipeptidyl	306)
f(92-100)	VLVLDTDYK		Peptidase-IV)	(299)
f(46-54)	LKPTPEGDL			
f(46-57)	LKPTPEGDLEIL	Pepsin		(297)
f(78-86)	IPAVFKIDA			
f(71-75)	IIAEK			
f(9-14)	GLDIQK			
f(142-146)	ALPMH	Trypsin	Hypo-cholesterolemic	(320)
f(41-60)	VYVEELKPTPEGDLEIL LQK			
f(102-105)	YLLF	Pepsin + trypsin or chymotrypsin	Opioid	(321, 322)

f(146-149)	HIRL	Chymotrypsin	Opioid	
			Antihypertensive	
			Analgesic	(323,
			Antinociceptive	324)
			Hypo- cholesterolemic	

4-2 材料と方法

4-2-1 倫理的承認

全ての遺伝子組換え実験は、「信州大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則り、機関長の承認を受けて法令・指針等の申請に基づいた制限環境下にて行った（承認番号：11-009）。全ての動物実験は、「信州大学動物実験等実施規程」に則り、機関長の承認を受けて法令・指針等の申請に基づいた制限環境下にて実施した（承認番号：230005）。

4-2-2 菌株と培養条件

組換え遺伝子の発現宿主は *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (NZ9000; VS-ELS09000-01, MoBiTec GmbH, Goettingen, Germany) を用いた。NZ9000 は 0.5% glucose (16805-35, Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) を含む M17 培地 (CM0817, Oxoid Limited, Hampshire, UK) (GM17) で培養した。必要に応じて、GM17 に chloramphenicol (08027-14, Nacalai Tesque, Inc.) (20 µg/mL) を添加した (GM17cm)。 *Escherichia* (*E.*) *coli* JM109 (JM109; 9052, TaKaRa Bio Inc., Shiga, Japan) および MC1061 (MC1061; VS-ELS10610-01, MoBiTec GmbH) は、Luria-Bertani (LB) 培地 (1.10285.055, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) で培養した。必要に応じて、LB 培地に chloramphenicol (25 µg/mL) もしくは ampicillin (02739-74, Nacalai Tesque, Inc.) (50 µg/mL) を添加した。寒天培地は、液体培地に 1.5%(w/v)の寒天 (01162-15, Nacalai Tesque, Inc.) を添加し作成した。

4-2-3 遺伝子発現ベクターの構築

一般的な遺伝子工学技術は過去の知見に従った(210)。

nisA のプロモーター (P_{nis}) 配列および *Usp45* のシグナルペプチド配列 (SP_{usp45}) の融合体をコードする遺伝子 (Fig. 4-1) を合成した。bBLG をコードする遺伝子 (accession number: EU883598) は *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 のコドン使用頻度に最適化し合成した (Fig. 4-2)。遺伝子合成は Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) に委託し、合成遺伝子はプラスミド (P_{nis} - SP_{usp45} : pEX-A, bBLG: pGEM-T easy) を用いてクローニングした。納品されたプラスミドは *E. coli* JM109 を用いて増幅し、以後の実験に用いた。

はじめに、組換え遺伝子の分泌型発現ベクター (pNZ8148#2:SEC, Fig. 4-3) の構築に取り組んだ。乳酸菌用遺伝子発現ベクター (pNZ8148#2:CYT (133)) および pEX-A- P_{nis} - SP_{usp45} は制限酵素 (*Bgl*I: 1021A, *Nco*I: 1160A, TaKaRa Bio

Inc.) を用いて切断した (restriction enzymatic reaction-A, Table 4-2)。目的断片は 1% agarose (346-07831, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) ゲルを用いた電気泳動にて確認後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (FG-91202, NIPPON Genetics Co.Ltd, Tokyo, Japan) を用いて精製した。精製 DNA 断片は T4 DNA Ligase (M180A, Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いてライゲーション (Table 4-3) し、*E. coli* MC1061 へ導入した。LBcm 寒天培地上に得られたコロニーはプライマー (pNZ F3126: 5'-TGCCCCGTTAGTTGAAGAAG-3'/pNZ R340: 5'-TCAATCAAAGCAACACG TGC-3', Eurofins Genomics K.K.の受託サービスに合成を依頼した) を用いたコロニーPCR (Table 4-4) で解析した。コロニーを LBcm 液体培地に釣菌し、16 - 20 hr 振盪 (220 rpm) 培養後、FastGene Plasmid Mini Kit (FG-90402, NIPPON Genetics Co.Ltd) を用いてプラスミドを抽出した。

続いて、bBLG 発現ベクターの構築に取り組んだ。pNZ8148#2:SEC および pGEM-T easy-BLG は制限酵素 (*Kpn*I: 1068A, *Hind*III: 1060A, TaKaRa Bio Inc.) を用いて切断した (restriction enzymatic reaction-B, Table 4-5)。以後、上述と同様に、ライゲーション、コロニーPCR、プラスミドの精製を行った。

精製プラスミドはプライマー (pNZ F3126, pNZ R340) を用いてシーケンス解析 (Eurofins Genomics K.K.に委託) に供した。結果は遺伝子解析ソフト (GENETYX-MAC Ver. 18.0.3, GENETYX, Tokyo, Japan) を用いて解析した。挿入遺伝子に変異・欠損のないことを確認し pNZ8148#2:SEC (Fig. 4-3 A) および pNZ8148#2:SEC-BLG (Fig. 4-3 B) の構築に成功した。

4-2-4 gmNZ9000 の構築

NZ9000 のコンピテントセルは MoBiTec GmbH の説明書通りに調製した。pNZ8148#2:SEC および pNZ8148#2:SEC-BLG は、それぞれ電気穿孔法を用いて NZ9000 に導入した。すなわち、氷冷した 0.1 cm ギャップエレクトロポレーションキュベット (1652089, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) にコンピテントセル懸濁液 (40 μ L) およびプラスミド (100 - 500 ng) を加え、Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いてパルス (2,000 V, 25 μ F, 200 Ω) した。キュベットに 500 μ L の氷冷 GM17 SOC 液体培地 (20 mM magnesium chloride (20935-05, Nacalai Tesque, Inc.)、2 mM calcium chloride (06730-15, Nacalai Tesque, Inc.) を含む GM17) を加え、氷上に 5 min 放置した。30°C で 2 hr 静置培養後、GM17cm 寒天培地に播き、さらに一晩培養した。得られたコロニーは GM17cm 液体培地に釣菌し、一晩培養後、終濃度が 20%(v/v) になるようグリセロール (09886-05, Nacalai Tesque, Inc.) を

添加し、-80℃で保存した。

4-2-5 gmNZ9000 における組換え遺伝子の発現誘導

組換え遺伝子の発現誘導は、2 mL もしくは 4 L 系で行った。30℃に温めた GM17cm 液体培地に gmNZ9000 の一晚培養液を 5%(v/v)接種し、 $OD_{600} = 0.4$ になるまで静置培養した。粗 nisin (2.5%(w/w) のナイシンを含む, VS-ELK01000-02, MoBiTec GmbH) を終濃度 0 - 500 ng/mL になるように培養液に加え、さらに 3 hr 静置培養した。培養終了後、 OD_{600} を測定した。

4-2-6 細胞抽出液および培養液上清画分の調製

4-2-6-1 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳 (SDS-PAGE) /ウエスタンブロッティング用

4-2-5 の通り、2 mL 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心 ($8,000 \times g$, 4℃, 5 min) により細胞ペレットと培養液上清を分離した。細胞ペレットは 1 mL の TES (Table 4-6) に懸濁し、遠心 ($8,000 \times g$, 4℃, 5 min) することで洗浄した。得られた細胞ペレットは $70 \mu\text{L}/OD_{600} = 1$ の TES-L (5 mg/mL lysozyme chloride (20841-54, Nacalai Tesque, Inc.) および protease inhibitor cocktail (11836153001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を含む TES) に再懸濁し、時々ノックをしながら 37℃, 30 min 放置した。放置後、 $30 \mu\text{L}/OD_{600} = 1$ の 20%(w/v) sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) を添加し、さらに $100 \mu\text{L}/OD_{600} = 1$ の 2× Laemmli sample buffer (196-11022, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を加えた。溶液を 95℃で 5 min 加温し、SDS 化した。培養液上清を 1,500 μL 回収し、氷冷した 100%(w/v) trichloroacetic acid (T4885, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を 300 μL 加えよく混和した。氷上に 3 hr 放置し、遠心 ($20,600 \times g$, 4℃, 15 min) により沈殿物を回収した。沈殿物を 200 μL の acetone (00310-95, Nacalai Tesque, Inc.) に懸濁し、遠心 ($20,600 \times g$, 4℃, 15 min) することで洗浄した。洗浄は他に 2 回繰り返した。得られた沈殿物を 50℃で完全に乾燥し、 $13 \mu\text{L}/OD_{600} = 1$ の TE (sucrose を含まない TES) に溶解した。等量の 2× Laemmli sample buffer を加え、室温で一晩放置することで SDS 化した。

4-2-6-2 精製用

4-2-5 の通り、4 L 系で組換え遺伝子の発現を誘導した。遠心 ($3,000 \times g$, 4℃,

20 min) により細胞ペレットを回収した。細胞ペレットは 800 mL の精製用 buffer (IMAC0, Table 4-7) に懸濁し、遠心 ($3,000 \times g$, 4°C , 20 min) することで洗浄した。洗浄は他に 1 回繰り返した。得られた細胞ペレットは -80°C で凍結し、菌体重量の 3 倍量の aluminum oxide (019-01975, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いて乳鉢上ですり潰した (on ice, 15 min)。菌体破砕物は、160 mL の ethylenediaminetetraacetic acid-free protease inhibitor cocktail (11836170001, Roche Diagnostics GmbH) を含む IMAC0 で回収した。遠心 ($15,000 \times g$, 4°C , 15 min) 後、可溶性画分を細胞抽出液として回収した。細胞抽出液はシリンジフィルター (pore size: $0.2 \mu\text{m}$; 17597-K, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) を用いて清澄化し、直ちに精製 (3-2-9 参照) に用いた。

4-2-7 SDS-PAGE/ウェスタンブロッティング

4-2-6-1 および 4-2-8 で得たサンプルは、15%(v/v) ポリアクリルアミドゲル (Table 4-8) を用いた SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE には Running buffer (Table 4-9) を用い、定電流下 (10 mA) でサンプルを濃縮後、定電圧下 (200 V) でおよそ 50 min 泳動した。泳動終了後、展開したバンドを PVDF 膜 (10600029, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) に転写した。転写には Transfer buffer (Table 4-10) を用い、定電圧下 (100 V) で 1 hr 通電した。転写終了後、膜を 5%(w/v) skim milk (MORINAGA MILK INDUSTRY Co., LTD., Tokyo, Japan) を含む 0.05% (v/v) Tween20 (35624-15, Nacalai Tesque, Inc.) 含 tris-buffered saline (TBS-T, Table 4-11) に室温で 1 hr 浸すことでブロッキングした。適量の TBS-T を用いて膜を 3 回洗浄し、mouse anti-His-tag antibody (1/1000) (652501, BioLegend, San Diego, CA, USA) を含む TBS-T に 4°C で一晩浸した。適量の TBS-T を用いて膜を 3 回洗浄し、horseradish peroxidase (HRP) -conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1/5000) (A4416, Sigma-Aldrich Co. LLC.) を含む TBS-T に室温で 1 hr 浸した。発色基質は ECL Western Blotting Analysis System (RPN2109, GE Healthcare) を用い、バンドは ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いて検出した。

4-2-8 rBLG の精製

His-Trap HP カラム (17524701, GE Healthcare) を用いて、NZ-BLG 細胞抽出液より rBLG を精製した。4-2-6-2 で得られた細胞抽出液は、IMAC0 で平衡化したカラムにロードした。10 column volumes (CV) の 20 mM imidazole

(19028-22, Nacalai Tesque, Inc.) を含む IMAC0 を用いてカラムを洗浄した。カラムに結合したタンパク質は、様々な濃度の imidazole (31, 63, 125, 250, 500 mM) を含む IMAC0 (各 5 CV) を用いて溶出した。カラムへの液体の充填はシリンジ (TERUMO Corporation, Tokyo, Japan) を用い、流速は 1 mL/min で実施した。得られた各画分 (精製前、フロースルー、洗浄および溶出) は、4-2-7 の通りウエスタンブロッティングを用いて解析した。溶出画分は、TBS (Table 4-11) を用いて一晩透析し、-80°C で保存した。

4-2-9 BLG トリプシン分解物の DPP-IV 阻害活性の検討

4-2-9-1 BLG トリプシン分解物の調製

精製 rBLG は TBS を用いて 50 µg/mL に希釈した。市販の bBLG (cBLG, L3908, Sigma-Aldrich Co. LLC.) は TBS を用いて 1 mg/mL に調製した。精製 rBLG 溶液および cBLG 溶液にブタ膵臓由来トリプシン (201-10191, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を添加し (基質: 酵素 = 20 : 1)、37°C で 24 hr インキュベートした。酵素反応は、反応液を 90°C で 5 min 加温することで停止した。溶液は使用するまで -80°C で保存した。

4-2-9-2 DPP-IV 阻害活性の解析

4-2-9-1 で得られた BLG トリプシン分解物の DPP-IV 阻害活性試験は、DPP-IV Drug Discovery Kit (BML-AK499-0001, Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA) を用いて、説明書通りに実施した。

4-2-10 rBLG のアレルゲン性の検討

4-2-10-1 マウス

4 週齢の BALB/c マウス (メス) は、Japan SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。マウスは、照明と室温の管理環境下で飼育し、通常飼料 (MF, Oriental Yeast Co., LTD., Tokyo, Japan) および滅菌水を自由摂取した。マウスは、1 週間の予備飼育後、実験に供した。

4-2-10-2 cBLG 感作マウスの作成

マウスに 100 µg の cBLG と 100 µL の Freund's complete adjuvant (263810, DIFCO Laboratories, Detroit, MI, USA) を含む溶液 (total 200 µL) を腹腔内投与 (i.p.) した。初回投与の 2 および 4 週間後、100 µg の cBLG

と 100 μ L の Freund's incomplete adjuvant (263910, DIFCO Laboratories) を含む溶液 (total 200 μ L) を i.p.した。i.p.には 1 mL ツベルクリン用シリンジ (SS-01T, TERUMO Corporation) と 26 G \times 1/2 注射針 (NN-2613S, TERUMO Corporation) を用いた。

4-2-10-3 脾臓細胞の調製と刺激

4-2-10-2 における最終 i.p.の 1 週間後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓を摘出した。シャーレ上で脾臓をすりつぶし、完全 RPMI 1640 培地 (Table 4-12) に回収した。滅菌超純水を用いて赤血球を溶血し、セルストレイナー (pore size: 40 μ m, 3523490, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) を用いて結合組織や凝集細胞を除去した。得られた脾臓細胞懸濁液の一部を 0.4% trypan blue 溶液 (T10282, Life Technologies Corporation, Eugene, OR, USA) と混和し、Countess cell counting chamber slides (C10283, Invitrogen Corporation, Eugene, OR, USA) に封入後、Countess automated cell counter (Invitrogen Corporation) を用いて生細胞数を測定した。脾臓細胞懸濁液は、完全 RPMI 1640 培地を用いて 5×10^6 cells/mL に調製し、2 mL/well (1×10^7 cells/well) になるよう 6-well plate (5530500, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) に播種した。37°C, 5% CO₂ 条件下において 3 hr 前培養した後、cBLG もしくは精製 rBLG を、50 もしくは 100 μ g/mL になるよう培養液に添加した。培養液は、37°C, 5% CO₂ 条件下において 72 hr 培養した。

4-2-10-4 Real-time 定量的 PCR

High Pure RNA Isolation Kit (11828665001, Roche Diagnostics GmbH) を用いて、4-2-10-3 で刺激した脾臓細胞より total RNA を精製した。PrimeScript RT reagent Kit (RR037A, TaKaRa Bio Inc.) を用いて total RNA より cDNA を合成し、EASY Dilution (9160, TaKaRa Bio Inc.) を用いて反応溶液を 10 倍希釈した。Real-time 定量的 PCR は Table 4-13 の通り実施した。マウス β -actin およびマウス IL-13 特異的プライマーは TaKaRa Bio Inc.より購入した。

4-2-11 統計解析

すべての統計解析は、統計解析ソフトウェア (ystat2004.xls, Igakutosho Shuppan, Tokyo, Japan) を用いて実施した。一元配置分散分析に引き続く Dunnett's test もしくは Student-Newman-Keuls test を用いて検出した。有意水準 α は 0.05 を用いた。

AGTCTTATAACTATACTGACAATAGAAACATTAACAAATCTAAACAGTCTTAATTCTATCTTGAGAAAGTA
 TTGGTAATAATATTATTGTCGATAACGCGAGCATAATAAACGGCTCTGATTAAATTCTGAAGTTTGTTAGAT
 ACAATGATTTGTTTGAAGGAAGTACAAAATAAATTATAAGGAGGCACTCACCATGAAAAAAAAAGATTATCT
 CAGCTATTTTAATGTCTACAGTGATACTTTCTGCTGCAGCCCCGTTGTCAGGTGTTTACGCTG

Fig. 4-1 A DNA sequence coding for P_{nis} - SP_{usp45} . The black and blue sequences indicate P_{nis} and SP_{usp45} , respectively.

AAGTGCTTATTGCTTGCACTAGCTTTAACTTGTGGTGACAAAGCGTTAATTGTTACTCAGACCATGAAAGGA
 TTGGATATACAAAAAGTTGCAGGGACTTGGTATTCCTTGCCTGGCTGCAAGCGACATTTATTATTGGAC
 GCTCAAAGTGCTCCACTTAGAGTTTATGTAGAGGAATTAACCTACGCCTGAGGGAGATTAGAAATCCTG
 CTACAAAATGGGAAAATGATGAATGTGCTCAAAAAAAAAATTATTGCGGAAAAAACTAAAATTCCTGCTGTT
 TTTAAAATTGATGCATTGAACGAAAATAAAGTCCTTGTGTTAGACACTGATTATAAAAAAGTACTTGTGTTT
 TGTATGGAAAATAGTGCTGAACCAGAACAACTCACTCGTTTGCCAATGTCTTGTTCTACACCAGAGGTTGAC
 GATGAAGCTCTAGAAAAATTTGATAAAGCCCTCAAAGCACTTCCAATGCATATCAGACTTTCTTTCAATCCC
 ACACAACTGGAAGAACAATGTCATATT

Fig. 4-2 A DNA sequence coding for bBLG (accession number: EU883598) was synthesized upon codon optimization for *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363.

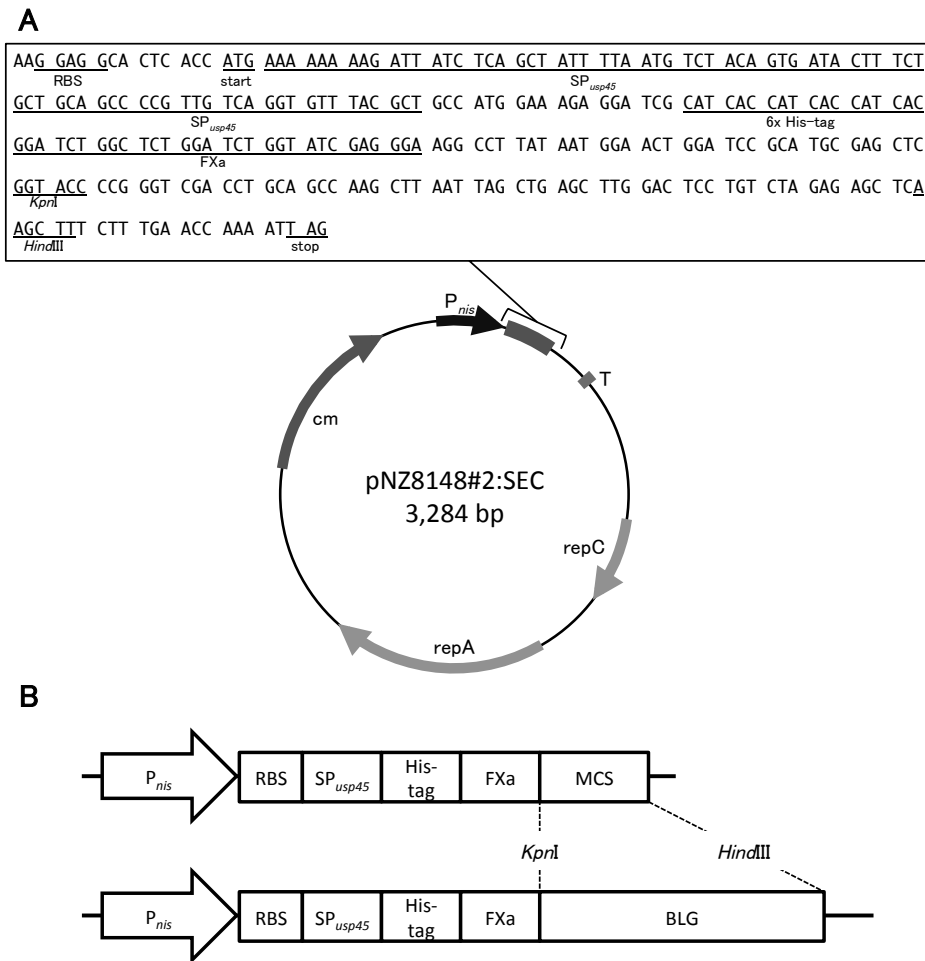


Fig. 4-3 Maps of vectors used in this study. (A) Schematic representation of the secretion vector, pNZ8148#2:SEC. The DNA sequence between the RBS and the stop codon is presented in the rectangle. (B) The codon-optimized BLG gene (537 bp) was cloned into pNZ8148#2:SEC (*above*) between the *KpnI* and *HindIII* restriction enzyme recognition sites, and the resulting plasmid was designated pNZ8148#2:SEC-BLG (*below*). *P_{nis}*: nisin A promoter, *RBS*: ribosome binding site, *SP_{usp45}*: sequence of the signal peptide from the USP45 protein, *His-tag*: hexahistidine tag, *FXa*: factor Xa recognition site, *MCS*: multiple cloning site, *T*: terminator, *rep*: replication gene, *cm*: chloramphenicol acetyltransferase gene, *BLG*: bovine β -lactoglobulin-coding gene. The figure is taken from Shigemori et al (211).

Table 4-2 Reaction solution and conditions for restriction enzymatic reaction-A.

Component of reaction solution	
10× K buffer (TaKaRa Bio Inc.)	2 µL
10× bovine serum albumin (TaKaRa Bio Inc.)	2 µL
DNA (pNZ8148#2:CYT or pEX-A-P _{nis} -SP _{usp45})	1 ng
<i>Bgl</i> III (1021A, TaKaRa Bio Inc.)	1 µL
<i>Nco</i> I (1160A, TaKaRa Bio Inc.)	1 µL
Ultrapure water	up to 20 µL
Condition for reaction	
37 °C	overnight
75 °C	15 min

Table 4-3 Reaction solution and conditions for ligation.

Component of reaction solution	
10× buffer (Promega Corporation)	2 µL
DNA	8 µL
T4 DNA Ligase (M180A, Promega Corporation)	1 µL
Condition for reaction	
4 °C	overnight

Table 4-4 Reaction solution and conditions for colony-direct PCR.

Component of reaction solution	
EmeraldAmp PCR Master Mix (RR300A, TaKaRa Bio Inc.)	5 μ L
Primer mixture (pNZ F3126/pNZ R340, 10 μ M each)	0.5 μ L
Ultrapure water	4.5 μ L
Colony	trace
Condition for reaction	
95 °C	5 min
95 °C	30 sec
60 °C	30 sec
72 °C	1 min
40 cycles	
4 °C	soak

Table 4-5 Reaction solution and conditions for restriction enzymatic reaction-B.

Component of reaction solution	
10× K buffer (TaKaRa Bio Inc.)	2 μ L
DNA (pNZ8148#2:SEC or pGEM-T easy-bBLG)	1 ng
<i>kpn</i> I (1068A, TaKaRa Bio Inc.)	1 μ L
<i>Hind</i> III (1060A, TaKaRa Bio Inc.)	1 μ L
Ultrapure water	up to 20 μ L
Condition for reaction	
37 °C	overnight
75 °C	15 min

Table 4-6 Composition of TES.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	10 mM
Ethylenediaminetetraacetic acid (14347-21, Nacalai Tesque, Inc.)	1 mM
Sucrose (30404-45, Nacalai Tesque, Inc.)	25 %
<i>in distilled water</i>	
pH 8.0	

Table 4-7 Composition of IMAC0.

Sodium phosphate (31801-05, Nacalai Tesque, Inc.)	20 mM
Sodium chloride (09649-15, Nacalai Tesque, Inc.)	500 mM
<i>in distilled water</i>	
pH 8.0	

Table 4-8 Composition of polyacrylamide gel.

Component of running gel	
30%(w/v) acrylamide (018-25625, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	4,000 µL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	2,000 µL
10% sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	80 µL
10% ammonium persulfate (A3678, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	27 µL
Tetramethylethylenediamine (205-06313, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	4 µL
Distilled water	1,920 µL
Component of stacking gel	
30%(w/v) acrylamide (018-25625, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	400 µL
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	625 µL
10% sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	25 µL
10% ammonium persulfate (A3678, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	8.3 µL
Tetramethylethylenediamine (205-06313, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)	2.5 µL
Distilled water	1,440 µL

Table 4-9 Composition of Running buffer.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Glycine (17109-35, Nacalai Tesque, Inc.)	14.4 g
Sodium dodecyl sulfate (L3771, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	1 g
Distilled water	up to 1 L

Table 4-10 Composition of Transfer buffer.

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Glycine (17109-35, Nacalai Tesque, Inc.)	14.4 g
Methanol (21914-03, Nacalai Tesque, Inc.)	100 mL
Distilled water	up to 1 L

Table 4-11 Composition of TBS(-T).

Tris (35406-91, Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Potassium chloride (28538-75, Nacalai Tesque, Inc.)	0.2 g
Sodium chloride (09649-15, Nacalai Tesque, Inc.)	8 g
*Tween20 (35624-15, Nacalai Tesque, Inc.)	0.5 mL
Distilled water	up to 1 L

pH 7.4 (TBS-T), pH 8.0 (TBS)

*if necessary

Table 4-12 Composition of complete RPMI 1640 medium.

Heat inactivated fetal calf serum (SH30910.03, GE Healthcare)	50 mL
MEM nonessential amino acids solution (06344-56, Nacalai Tesque, Inc.)	5 mL
Penicillin-streptomycin-glutamine mixed solution (06168-34, Nacalai Tesque, Inc.)	5 mL
2-mercaptoethanol (M7522, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	17.5 μ L
1 M HEPES sodium salt solution (H3662, Sigma-Aldrich Co. LLC.)	5 mL
100 mM sodium pyruvate solution (06977-34, Nacalai Tesque, Inc.)	5 mL
RPMI 1640 (C22400500BT, Life Technologies Corporation)	500 mL

Table 4-13 Reaction solution and conditions for real-time quantitative PCR.

Component of reaction solution	
SYBR <i>Premix Ex Taq</i> II (Tli RNaseH Plus) (RR820, TaKaRa Bio Inc.)	10 μ L
Primer mixture (10 μ M each, TaKaRa Bio Inc.)	1 μ L
cDNA solution	9 μ L
Condition for reaction	
95 °C	10 sec
95 °C	5 sec
60 °C	5 sec
45 cycles	
Dissociation	

4-3 結果

4-3-1 NZ-BLG はナイシン刺激依存的に rBLG を産生・分泌する

ウエスタンブロッティングにおいて、ナイシン添加培地で培養した NZ-BLG 由来の細胞抽出液より rBLG の分泌前駆体 (27.0 kDa) および分泌型 rBLG (24.3 kDa) の分子量に一致するバンドを観察した (Fig. 4-4 A)。また、同培養液由来の培養液上清画分からは、分泌型 rBLG に一致するシングルバンドを検出した (Fig. 4-4 B)。一方で、ナイシン添加培地で培養した NZ-VC およびナイシン無添加培地で培養した 2 種の gmNZ9000 の細胞抽出液および培養液上清画分からは、rBLG のサイズに一致するバンドは検出されなかった (Fig. 4-4)。

4-3-2 NZ-BLG における rBLG の分泌条件の最適化

NZ-BLG における rBLG の産生および分泌は、培地へのナイシン添加濃度依存的に増加した (Fig. 4-5 B)。一方で、ナイシン添加 3 hr 後における NZ-BLG 培養液の OD₆₀₀ 値は、ナイシン添加濃度依存的に減少した (Fig. 4-5 A)。とくに、16 ng/mL 以上の粗ナイシン溶液を含む培養液において著しい OD₆₀₀ 値の減少が観察された (Fig. 4-5 A)。また、16 ng/mL 以上の粗ナイシン溶液を含む培養液の上清画分において rBLG 分泌前駆体のバンドを確認し (Fig. 4-5 B, SUP)、細胞内タンパク質の漏出が示唆された。

4-3-3 NZ-BLG からの rBLG の精製

His-Trap HP カラムを用いて、ナイシン誘導した NZ-BLG の細胞抽出液より rBLG を精製した。カラムに吸着した rBLG は、主に 63 および 125 mM Imidazole を含む IMAC0 により溶出された (Fig. 4-6)。しかし、これら 2 つの画分には無関係なタンパク質が相当量含まれていた。そこで、以後の実験には、より精製度の高い 250 および 500 mM Imidazole 溶出画分を用いた。

4-3-4 rBLG トリプシン分解物は DPP-IV 活性を阻害する

cBLG トリプシン分解物は、濃度依存的に DPP-IV 活性を阻害した (Fig. 4-7 A)。精製 rBLG のトリプシン分解物は、等量の cBLG トリプシン分解物と同等に、DPP-IV 活性を著しく阻害した (Fig. 4-7 B)。

4-3-5 rBLG はアレルゲン性を有する

精製 rBLG は、cBLG 感作マウスの脾臓細胞における IL-13 mRNA 発現を濃度依存的に誘導した (Fig. 4-8)。同様の傾向は、刺激物質として cBLG を用いた際

にも観察された (Fig. 4-8)。

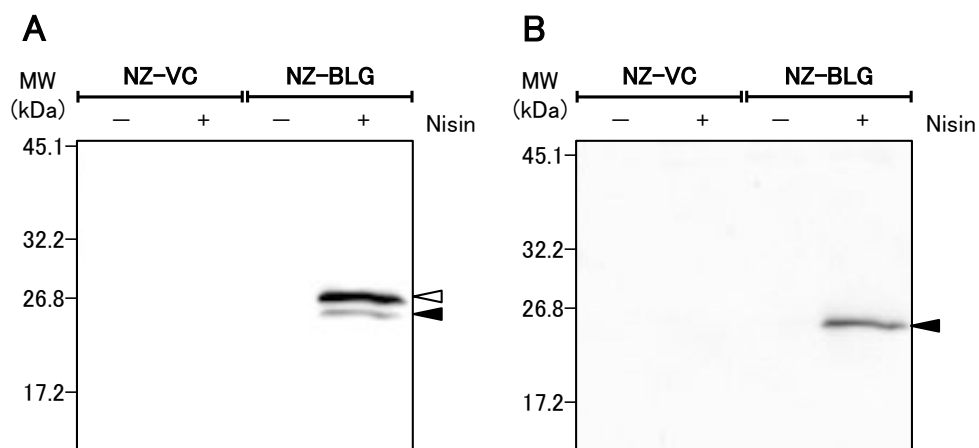


Fig. 4-4 Secretion of rBLG by NZ9000. Two gmNZ9000 strains were cultured with (+) or without (-) 10 ng/mL of crude nisin. Protein extracts from cells (A) or culture supernatants (B) were analyzed by western blotting with an anti-His-tag Ab. White and black arrowheads indicate the secretory rBLG precursor (pre-rBLG, 27.0 kDa) and the secretory form of rBLG (24.3 kDa), respectively. *MW*: molecular weight. The figure is taken from Shigemori et al (211).

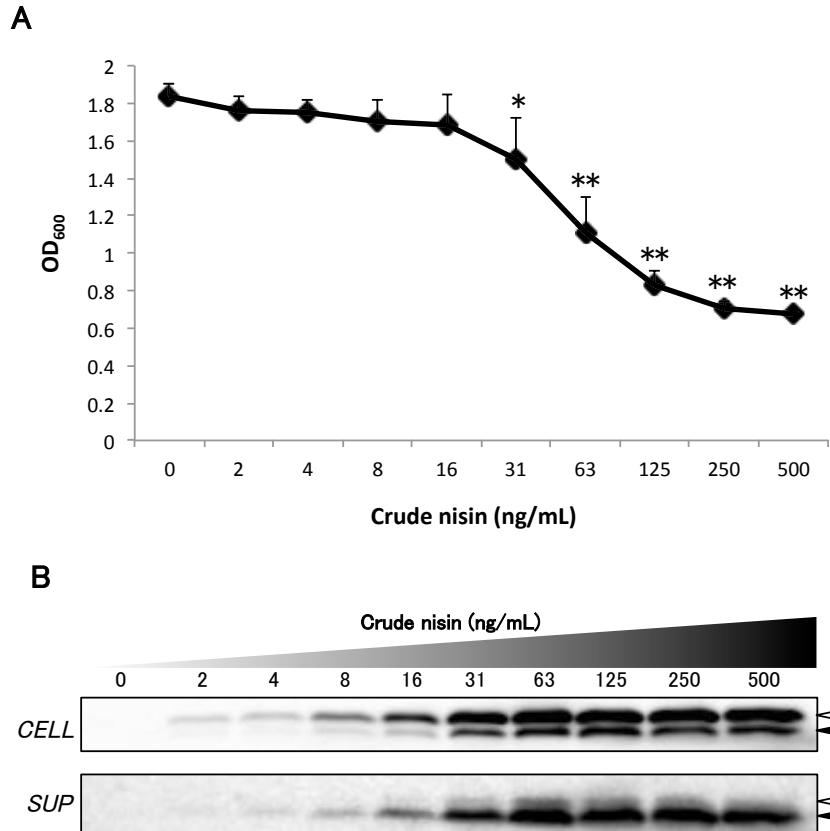


Fig. 4-5 Determination of the optimal nisin concentration for secretion of rBLG. (A) A strain NZ-BLG was cultured with various concentrations of nisin (0 to 500 ng/mL). After 3 h of incubation, the OD₆₀₀ of each sample was measured. The mean and SD from three independent experiments are shown. (B) Protein extracts from cells (*CELL*, above) or culture supernatants (*SUP*, below) were analyzed by western blotting with an anti-His-tag Ab. Representative images from three independent experiments are shown. White and black arrowheads indicate the secretory rBLG precursor (pre-rBLG, 27.0 kDa) and the secretory form of rBLG (24.3 kDa), respectively. The figure is taken from Shigemori et al (211).

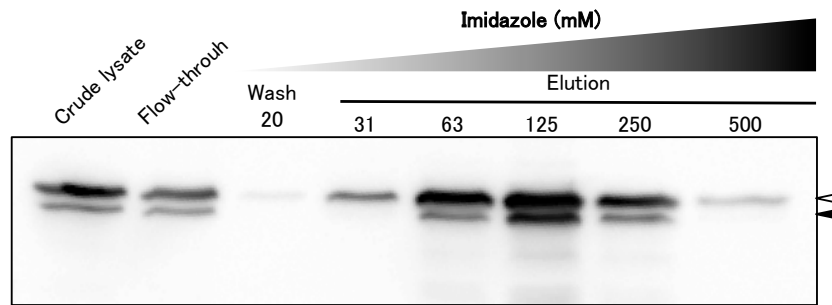


Fig. 4-6 Purification of rBLG. A strain NZ-BLG was cultured with nisin in a 4-L large-scale culture. The cell extract (*Crude lysate*) was prepared and then passed through a HisTrap HP column (*Flow-through*). The column was washed with Wash buffer to remove non-adsorbed protein (*Wash*) and then eluted (*Elution*) with Wash buffer containing 20 mM imidazole and Elution buffers containing 31 to 500 mM imidazole. All fractions were analyzed by western blotting with an anti-His-tag Ab. White and black arrowheads indicate the secretory rBLG precursor (pre-rBLG, 27.0 kDa) and the secretory form of rBLG (24.3 kDa), respectively. The figure is taken from Shigemori et al (211).

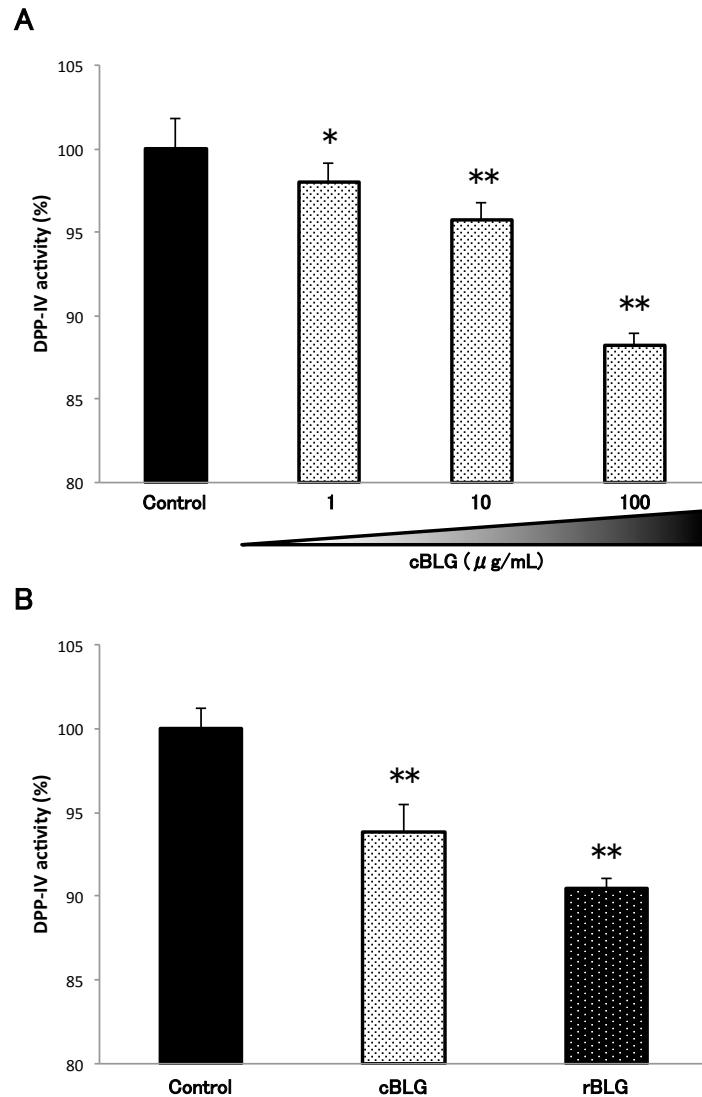


Fig. 4-7 Inhibition of DPP-IV activity by trypsin-digested rBLG. Various concentrations of trypsin-digested cBLG (A) or trypsin hydrolysates of 50 $\mu\text{g/mL}$ of either cBLG or purified rBLG (B) were evaluated for inhibitory activity against DPP-IV using a DPP-IV Drug Discovery Kit. Concentrations indicated are the protein concentrations before trypsin treatment. Data are expressed as percent activity remaining in test samples versus that in the control (no sample added). *Black, dotted white, and dotted black bars* indicate control, cBLG, and purified rBLG (rBLG), respectively. Values represent means and error bars indicate SD ($n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ versus Control. The figure is taken from Shigemori et al (211).

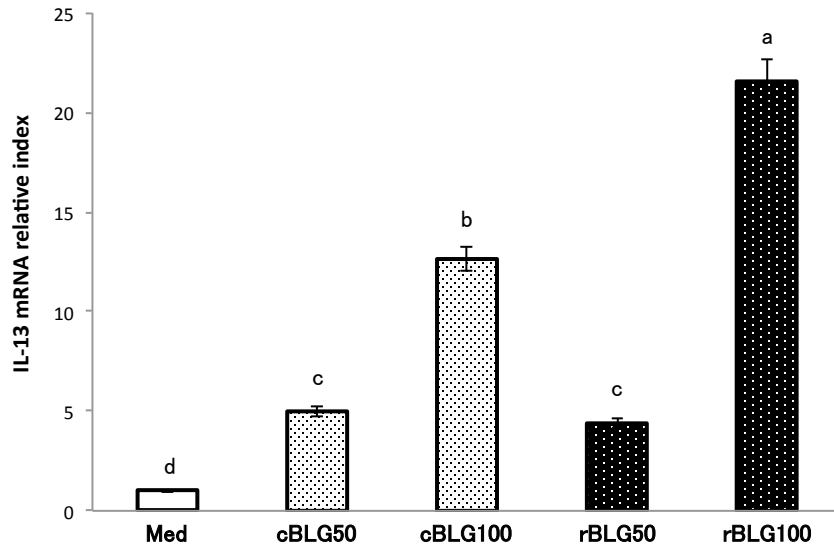


Fig. 4-8 Allergenicity of rBLG. Splenocytes isolated from cBLG-sensitized BALB/c mice were stimulated in medium with or without (*Med*, *white bar*) 50 or 100 $\mu\text{g/mL}$ of cBLG (*cBLG*, *dotted-white bar*) or purified rBLG (*rBLG*, *dotted-black bar*). After 72 h, IL-13 mRNA levels were measured using real-time qPCR. Values represent means and error bars indicate SD ($n = 3$). Items indicated with different letters (i.e. *a*, *b*, *c*, and *d*) were significantly different ($p < 0.01$). Similar results were obtained from three different mice. The figure is taken from Shigemori et al (211).

4-4 考察

はじめに、bBLG を分泌する gm-*L. lactis* を構築するために、組換えタンパク質の分泌ベクター (pNZ8148#2:SEC) を構築した。以前の研究で作出した乳酸菌用遺伝子発現ベクター (pNZ8148#2:CYT (133, 134)) の *nisA* プロモーター下流域に、同種の Usp45 タンパク質に由来するシグナルペプチド配列を組み込んだ。Usp45 は、NZ9000 に存在する唯一の分泌タンパク質である(218)。細胞内に生成された Usp45 は、融合するシグナルペプチドにより細胞膜のタンパク質輸送装置へ運搬され、ここを通過する際にシグナルペプチドが切断することで、成熟タンパク質として細胞外へ分泌される(11)。NZ-BLG はナイシン刺激依存的にシグナルペプチドを融合した rBLG 分泌前駆体を細胞内に産生した。また、同株の培養液上清では、シグナルペプチドが切断した rBLG (分泌型 rBLG) の単一バンドを観察した。すなわち、rBLG はシグナルペプチドと細胞の分泌機構依存的に分泌されることが明らかになった。

ナイシンは、いくつかの *L. lactis* 株が産生する抗菌性ペプチド (バクテリオシン) で、典型的な type-A(l) lantibiotics に分類される(281)。ナイシンは様々なグラム陽性細菌に対して殺菌作用を発揮することから、多くの国において食品添加物として利用されている(30)。nisin-controlled gene expression (NICE) system は、*L. lactis* におけるナイシン生合成系を応用した誘導型遺伝子発現システムで、高い発現効率から gmLAB 研究で頻繁に用いられている(13)。本システムにおいて、組換え遺伝子の発現誘導剤として用いるナイシンの添加濃度は、組換えタンパク質の産生効率に重要である(6, 133, 134)。そこで本研究は、NZ-BLG における rBLG の分泌条件の最適化を目的に、培養液に添加するナイシンの濃度を検討した。ナイシン添加濃度依存的に rBLG の産生・分泌量が増加した。しかし、高濃度の粗ナイシン溶液 (> 31 ng/mL) の添加において、NZ-BLG の増殖は著しく阻害された。また、16 ng/mL 以上の粗ナイシン溶液の添加において、細胞内タンパク質 (rBLG 分泌前駆体) の細胞外への漏出が観察された。ナイシンは、主に 2 つのメカニズム (細胞膜への孔形成を介した溶菌、ペプチドグリカン前駆体である lipid II の除去を介した細胞壁の生合成の阻害) を介して殺菌活性を発揮する(30)。すなわち、高濃度のナイシンは、NZ-BLG の生育を阻害し、細胞内タンパク質の漏出を引き起こすことが考えられた。そこで本研究では、rBLG の分泌における最適粗ナイシン溶液濃度を、15 ng/mL と決定した。

2011 年、Uchida et al は、bBLG トリプシン分解物はマウスの糖代謝を高めることを示した(300)。加えて、同分解物は DPP-IV 活性を阻害することを、in vitro 研究にて明らかにした。本研究においても、cBLG トリプシン分解物は DPP-IV 活性を阻害することを確認した。重要なことに、精製 rBLG のトリプシン分解

物も同等の DPP-IV 阻害作用を発揮した。これまでの研究は、bBLG トリプシン分解物より幾つかの DPP-IV 阻害ペプチドを単離・同定することに成功している。例えば、Uchida et al は、bBLG より遊離したヘキサペプチド (VAGTWY) の DPP-IV 阻害活性 (50%阻害濃度 (IC_{50}) = 174 μ M) を証明した(300)。近年、Silveira et al は、強い DPP-IV 阻害活性 (IC_{50} = 44.7 μ M) を発揮するペンタペプチド (IPAVF) を同定した(299)。トリプシンは、膵液を介して小腸に分泌される消化酵素の一種である。すなわち、NZ-BLG を用いた bBLG の腸管デリバリーは、DPP-IV 阻害薬の in situ 生成システムとして有用かもしれない。

bBLG は牛乳アレルギーの主要なアレルゲンである(293)。Adel-Patient et al は、gmLAB を用いた bBLG の粘膜デリバリーは、マウスにおけるアレルギー反応 (Th2 型免疫反応) を軽減することを示した(126)。すなわち、bBLG を産生する gmLAB は、牛乳アレルギーに対する粘膜ワクチンとしての利用が期待されている。そこで本研究は、rBLG のアレルゲン性を検討した。精製 rBLG は、cBLG 感作マウスの脾臓細胞における IL-13 mRNA 発現を著しく誘導した。同様の反応は、cBLG で刺激した脾臓細胞においても観察された。IL-13 は、代表的な Th2 サイトカインであり、アレルギー性免疫応答の主要なメディエーターである(325)。従って、rBLG は cBLG と同等のアレルゲン性を有することが明らかになった。

まとめると、本研究は、bBLG を細胞外へ分泌する gm-*L. lactis* (NZ-BLG) の構築に成功した。また、NZ-BLG の培養時におけるナイシン添加濃度を検討することで、rBLG の分泌条件を最適化した。最後に、rBLG およびそのトリプシン分解物は、それぞれ cBLG と同等のアレルゲン性もしくは DPP-IV 阻害活性を発揮することを明らかにした。以上の結果から、NZ-BLG は 2 型糖尿病や牛乳アレルギーに対する予防・軽減薬として開発されることが期待される。

第五章

総論

5-1 研究成果の概要

およそ 30 年前、乳酸菌 (LAB) における遺伝子組換え技術の発展を背景に、病原体抗原タンパク質を産生する乳酸菌組換え体 (genetically modified LAB: gmLAB) を粘膜ワクチンとして利用するアイディアが提唱された(45)。以来、多種多様な生理活性タンパク質 (病原体抗原やアレルゲン、サイトカイン、抗体分子等) を産生する gmLAB の構築が報告され、それらの粘膜投与による疾患の予防・軽減効果が疾患モデル動物を用いた in vivo 試験において検証されてきた(7-9)。現在、本戦略は難治性疾患を含む様々な疾患 (感染症(19)やアレルギー(118)、炎症性疾患(140)、自己免疫疾患(119)) の有効な予防・治療戦略として注目されている。本研究分野は欧州において確立し、現在では北米や南米、中国の研究グループが次々に参入するなど急速に伸展している。しかし、我が国では遺伝子組換え技術に対する倫理上の問題から、これらの研究や有効利用に向けた取り組みはほとんど行われていない。そこで本研究は、我が国において gmLAB を安全・安心に利用するための基盤構築に向けた取り組みとして、“我が国発”の gmLAB を構築し、疾患の予防や軽減に向けた有用性を検討することで、我が国における基礎的知見の蓄積に貢献することを目的とした。

gmLAB を用いた抗炎症タンパク質の腸管標的化は、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases: IBD) の予防・治療戦略として有力視されている(140, 141)。しかし、インターロイキン (IL) -10 産生 gm-*Lactococcus* (*L.*) *lactis* を用いた臨床研究におけるクローン病治療の失敗を受け作用効率の改善が求められていた(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00729872)。そこで本研究は、多彩な抗炎症作用を発揮することから IBD の治療標的分子として注目される生体内酵素ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) に着目し、マウス HO-1 を分泌する gm-*L. lactis* (NZ-HO) を構築した(216)。NZ-HO が産生する組換えマウス HO-1 (rHO-1) は、基質となるヘムの分解活性を示すことから、生理活性を有することを明らかにした。次に、マウスに経口投与された NZ-HO は生きて大腸へ到達し、rHO-1 を大腸粘膜へ運搬することを示した。続いて、NZ-HO の抗炎症効果を IBD モデルマウスを用いた経口投与試験にて検討した。NZ-HO の経口投与は、ベクターコントロール株 (NZ-VC) の投与と比較して、デキストラン硫酸ナトリウムの自由摂取に誘導される急性大腸炎の症状を著しく軽減した。HO-1 は、抗炎症作用の発現において IL-10 を介した経路を活性化することから、大腸組織におけるサイトカインの発現レベルを解析した。NZ-HO を経口投与したマウスの大腸では IL-10 の産生レベルが増加し、炎症促進性サイトカイン (IL-1 α および IL-6) の発現が減少することを明らかにした。以上の研究成果から、gm-*L. lactis* を用いた HO-1 の腸管デリバリーは IBD の新規予防・軽減戦略として有用である

ことが示唆された。

IL-6 は IL-6 受容体 (IL-6R) を介する経路 (IL-6 シグナリング) を活性化することで、多面的な生理機能を発現するサイトカインであり、炎症性疾患や自己免疫疾患、ガンなどの病原因子として中心的な役割を果たしていることが示唆されている(251-254)。すなわち、IL-6 シグナリングを阻害するモノクローナル抗体はこれら疾患の治療薬として期待されている(251, 253, 257)。しかし、抗体薬は極めて高価なことが問題である。そこで本研究は、抗 IL-6 抗体の single-chain variable fragment (IL6scFv) を分泌する *gm-L. lactis* (NZ-IL6scFv) を構築した(229)。また、組換え遺伝子の発現における培養条件 (ナイシンの添加濃度と添加後の培養時間) を検討し、組換え IL6scFv (rIL6scFv) の分泌条件を最適化した。さらに、rIL6scFv は市販の組換えマウス IL-6 と結合することを酵素結合免疫吸着検定法にて示し、同組換えタンパク質は抗体としての免疫活性を有することを明らかにした。本研究は gmLAB における抗サイトカイン scFv の産生・分泌を示した世界初の成果となり、安価な抗体医療の実現に向けた基礎的知見を提供した。NZ-IL6scFv は IL-6 シグナリングの関与が示唆されている様々な疾患の予防・軽減ツールとして開発されることが期待される。

ウシ β ラクトグロブリン (bBLG) は、牛乳ホエイ中に豊富に含まれるタンパク質である(288-290)。これまでに、bBLG の胃腸管酵素 (トリプシンやペプシン) 分解物は多彩な生理活性を発揮することが報告された(288, 295)。そこで本研究は、bBLG を分泌する *gm-L. lactis* を構築し、同組換えタンパク質トリプシン分解物の dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) 阻害活性を検討した(211)。NZ-BLG の作出に先立ち、遺伝子発現ベクターの操作から、*gm-L. lactis* における組換えタンパク質の分泌システムを構築した。bBLG 遺伝子を含む分泌ベクターを組み込んだ *gm-L. lactis* (NZ-BLG) は、組換え bBLG (rBLG) を産生・分泌することを明らかにした。また、組換え遺伝子の発現誘導剤として用いるナイシンの培養液への添加濃度を検討し、rBLG の分泌に最適な条件を決定した。市販の *in vitro* アッセイキットを用いた試験において、rBLG のトリプシン分解物は、市販の bBLG 同分解物と同等の DPP-IV 阻害活性を示すことを明らかにした。DPP-IV 阻害剤は、2 型糖尿病の治療薬として利用されていることから、NZ-BLG は腸管における DPP-IV 阻害剤の *in situ* 生成システムとして有用かもしれない。以前、bBLG を産生する gmLAB は牛乳アレルギーの予防に有用であることが示唆された(126, 127, 130-132, 303)ことから、rBLG のアレルゲン性を検討した。市販の bBLG に感作したマウスの脾臓細胞培養系において、rBLG は IL-13 mRNA 発現を強く誘導することを示した。すなわち、rBLG はアレルゲン性を有することが明らかとなった。

5-2 今後の課題と展望

本研究分野の究極的な目標は、gmLAB を疾患の予防・治療薬もしくは機能性食品としてヒトや動物に用いることにある。しかし、主に遺伝子組換え微生物を用いる点において法的・倫理的制約があり、その実現には至っていない。一方で近年では、科学的アプローチからこの問題を解決しようとする取り組みがあり、上述の目標は少しずつ現実味を帯びてきている。そこで本論文では最後に、gmLAB を薬もしくは食品として開発するために解決すべき問題点とそれらに対する取り組みを解説し、今後の展望について述べる。

遺伝子組換え微生物を利用する上で最も問題とされる事柄の一つに、それらの自然環境への拡散がある。とくに、gmLAB を薬品もしくは食品として用いる本戦略においては、如何なる対策も講じない場合、それらが環境中に排泄される可能性は極めて高く、組換え微生物自身の作用や組換え遺伝子の水平伝播から予想だにしない影響を生態系に与える恐れがある。従って、gmLAB が自然環境において淘汰されるような厳密な仕組み「生物学的封じ込め」の戦略が必要である。この問題に対し、Steidler et al は、染色体上のチミジン合成関連遺伝子 (*thyA*) を、ヒト IL-10 をコードする配列に置き換えた gm-*L. lactis* (LL-Thy12) を構築した(169)。LL-Thy12 は、自身の生育に必須なチミジンを合成する能力を失い、大腸などの低チミジン環境下では生育することができない。実際に、ヒトモデルとしてのブタを用いた経口投与試験において、LL-Thy12 は糞便中にほとんど排泄されないことを示した。加えて、LL-Thy12 は水平伝播による *thyA* 遺伝子の獲得も実質的に起こさないことを明らかにした。本技術の開発を背景に、LL-Thy12 を用いた Phase 1 (170)および Phase 2a (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00729872) 臨床試験が行われた。いずれの試験においても、LL-Thy12 は被験者の消化管に封じ込められることが示された。さらに、ヒトにおける同封じ込め戦略の有益性は他の組換えタンパク質 (Trefol Factor 1) を産生する gm-*L. lactis* においても証明された(326)。すなわち、Steidler et al が開発した技術 (169)は、gmLAB の生物学的封じ込め戦略として極めて有効であることが示唆された。この他にも近年、*Nature* 誌において極めて頑強な生物学的封じ込め戦略が発表され(327, 328)、gmLAB を含む他の細菌への応用が期待されている。以上の研究成果は、gmLAB の生物学的封じ込め戦略として極めてポジティブかつ重要な知見である。今後はこれら技術の頑強性や安全性等に関して更なる知見の蓄積が望まれる。

これまでの歴史的な共生関係や豊富な食経験から、LAB はヒトや動物において安全な細菌であると認識されている (Generally Recognized As Safe: GRAS)。しかし、gmLAB の安全性に関してはこれとは別に議論する必要がある。すなわ

ち、LAB の遺伝子組換えが安全性に及ぼす影響を十分に評価する必要がある。これまで、動物やヒトを用いた研究において、gmLAB の粘膜投与により重篤な副作用が誘導された例は存在しない。加えて、これまでに実施されたいくつかの研究において gmLAB の安全性が示唆されている。例えば、de Moreno de LeBlanc et al は、IBD の治療薬候補として開発されたいくつか gmLAB は健常なマウスに長期間 (30 日間) 経口投与しても有害な副作用の原因にはならないことを示した (329)。また、ヒト免疫不全ウイルスの感染を予防する殺菌剤としての利用が期待される gm-*Lactobacillus jensenii* の経膣投与は、サル免疫不全ウイルスの感染モデル (アカゲザル) において有害な生体反応を引き起こすことなく膣環境を改善することが示された (330)。さらに、IBD やガン患者における臨床試験においても gmLAB の経口摂取による重篤な副作用は確認されなかった (61, 170, 326) (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00729872)。しかし、gmLAB の安全性に関する研究は近年始まったばかりであり、知見の数が絶対的に少ないことから、現時点においてその安全性が証明されたとは言えない。今後は、様々な gmLAB について横断的な検証が必要であり、副作用に関してもより多角的な評価が求められる。

現在、gmLAB の疾患予防・軽減における有用性は強く示唆されているものの、実際の有効性についてはほとんど不明瞭である。すなわち、これらの示唆は、主に齧歯類を用いた研究の成果であり、最終的に対象とする動物における臨床研究は乏しいと言わざるを得ない。しかし、LL-Thy12 を用いたクローン病治療の失敗 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00729872) や投与量過多 (マウスを用いた実験では連日 10^9 colony forming unit オーダーで投与される場合が多い) などの問題が存在することから、有効性を高めることは重要な課題であると言える。この問題に対しては、様々な角度からの取り組みが存在する。一つ目は、組換えタンパク質の産生量の増加である。例えば、Adel-Patient et al は、異なる量の BLG を産生する gm-*L. lactis* を作出し、それらのアレルギーワクチンとしての効果を BLG 感作マウスを用いた経口投与試験にて比較した。結果、1 細胞あたりの BLG 産生量が高い gm-*L. lactis* の経口投与において最も高い予防効果を得た (126)。この他にも、いくつかの研究において、組換えタンパク質の産生量の増加がワクチン効果を高めることを示している (52, 128)。二つ目は、組換えタンパク質の種類の検討である。これは主に、IBD の予防・軽減戦略の開発において検討されてきた。例えば、IBD モデルマウスを用いた経口投与試験において、IL-27 を分泌する gm-*L. lactis* は IL-10 分泌 gm-*L. lactis* よりも高い治療効果を発揮した (20)。同様に、生体内因性のセリンプロテアーゼインヒビターを分泌する gm-*L. lactis* は、抗炎症サイトカインを分泌する gm-*L. lactis* よりも実験的急性大腸炎

を著しく軽減した(189)。直接的な比較は実施していないものの、本研究で開発した NZ-HO や NZ-IL6scFv は、これまで試されていない生体機構を標的とすることから、本分野に新たな展開をもたらすかもしれない。三つ目は、組換えタンパク質の修飾である。Mohamadzadeh et al は、樹状細胞標的化ペプチドを融合した炭疽菌抗原を産生する gm-*Lactobacillus acidophilus* は、炭疽菌抗原を産生する同 gm-LAB と比較して、致死的な炭疽菌感染モデルにおいて高い予防効果をもたらすことを明らかにした(56)。Li et al は、M 細胞標的化ペプチドを融合した IL-6 を産生する gm-*L. lactis* は、IL-6 を産生する同 gm-LAB と比較して、高いアジュバント活性を発揮することを示した(331)。四つ目は、粘膜アジュバントの利用である。とくに、ワクチンアジュバントとしてのサイトカイン産生 gmLAB の利用が検討されてきた。例えば、Steidler et al は、破傷風毒素の無毒化断片を産生する gm-*L. lactis* の粘膜ワクチンとしての作用は、同 gmLAB に IL-2 もしくは IL-6 を共発現させることで増強されることを示した(25)。また、1 型糖尿病の治療ワクチンの開発では、自己抗原タンパク質と IL-10 を共発現する gm-*L. lactis* を用いた方法において最も高い治療効果が得られた(23, 26)。他にも、IL-1 β (332)や IL-12 (67, 127)を産生する gmLAB をアジュバントとして用いるアイディアが提唱されている。上述以外にも、組換えタンパク質の gmLAB における局在や“運び屋”として用いる LAB の種類も作用効率に関与することが示唆されている。

5-3 総括

gmLAB を用いた生理活性タンパク質の粘膜運搬システムは、難治性のものを含む様々な疾患を安価かつ効率的に予防・軽減するためのブレークスルー技術になる可能性を大いに秘めている。本戦略には、「遺伝子組換え微生物を生体に投与する」という、現時点では極めて高いハードルが存在する。しかし、欧米諸国を中心に急速に進められてきた大規模かつ包括的な基礎研究、画期的な技術革新および先進的な臨床研究によりそのハードルが着実に低くなっていることに疑いの余地はないだろう。しかしながら、我が国は遺伝子組換え技術に対する倫理的問題から大きな遅れを取ってきた。このような背景の中で、本研究では“我が国発”となる 3 種の gm-*L. lactis* の構築に成功し、疾患の予防や軽減に向けた利用価値を見出すに至った。具体的には以下の通りである。

1. HO-1 を分泌する gm-*L. lactis* (NZ-HO) の構築に成功した。また、NZ-HO の経口投与がマウスにおける急性大腸炎を軽減することを示し、IBD などの腸炎の予防・軽減ツールとして提案した (第二章(216))。
2. 生理活性を有する IL6scFv を分泌する gm-*L. lactis* (NZ-IL6scFv) の構築

に成功した。抗サイトカイン scFv を産生する gmLAB を世界ではじめて構築し、安価な抗体医薬の実現性を示唆した（第三章(229)）。

3. bBLG を分泌する gm-*L. lactis* (NZ-BLG) の構築に成功した。rBLG やそのトリプシン分解物は、市販の bBLG と同等のアレルゲン性および DPP-IV 阻害活性を有することを明らかにし、牛乳アレルギーや 2 型糖尿病の予防・治療薬の開発ツールとして提案した（第四章(211)）。

近年、我が国の遺伝子組換え微生物の利用に対する考え方は急激に変化しているように思える。例えば、これまで我が国において 2 件しか承認されていなかった遺伝子組換え生ワクチンの利用が、2015 年に 1 件、2016 年に 2 件、新たに承認された（農林水産省, “カルタヘナ法に基づき第一種使用規定を承認した遺伝子組換え生ワクチン一覧”, 平成 28 年 9 月 23 日）。重要なことに、これまで承認された生ワクチンは遺伝子組換えウイルスのみであったのに対し、今回初めて遺伝子組換え大腸菌（ニューカッスル病ウイルス由来 F 蛋白質遺伝子導入七面鳥ヘルペスウイルス HVT-NDV/F 株）の利用が認められた。2014 年、東京大学の研究グループは gmLAB を用いたヒトパピローマウイルスワクチンの臨床研究を世界に先駆けて実行し、その有益性を証明した(61)。これは極めて驚くべきことであり、我が国における gmLAB 研究の本格的な幕開けを感じる。これらの事実から、今後我が国において、gmLAB を活用するための取り組みが急速に進展することは十分にあり得る。本研究成果はこれらの取り組みにおいて有用な基礎知見になることを期待し、我が国そして世界で行われている gmLAB 研究に貢献することを願う。今後の研究において、gmLAB が疾患を予防・治療するための有効な手立てとして確立し、ヒトや動物の健やかな営みに貢献することを願って止まない。

参考文献

1. 日本乳酸菌学会. 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス. 京都府, 日本: 京都大学学術出版会 (2010) 11 月.
2. Hayashi H, Takahashi R, Nishi T, Sakamoto M, Benno Y. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *J Med Microbiol* (2005) **54**(11):1093-101. doi: 10.1099/jmm.0.45935-0
3. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2010) **7**(9):503-14. doi: 10.1038/nrgastro.2010.117
4. Sanchez B, Delgado S, Blanco-Miguez A, Lourenco A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res* (2016). doi: 10.1002/mnfr.201600240
5. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2014) **11**(8):506-14. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66
6. Bermudez-Humaran LG, Kharrat P, Chatel JM, Langella P. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microb Cell Fact* (2011) **10**(Suppl 1):S4. doi: 10.1186/1475-2859-10-s1-s4
7. Cano-Garrido O, Seras-Franzoso J, Garcia-Fruitos E. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. *Microb Cell Fact* (2015) **14**:137. doi: 10.1186/s12934-015-0313-6
8. Wells J. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol* (2011) **2**:423-45. doi: 10.1146/annurev-food-022510-133640
9. Wells JM, Mercenier A. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* (2008) **6**(5):349-62. doi: 10.1038/nrmicro1840
10. Jorgensen CM, Vrang A, Madsen SM. Recombinant protein expression in *Lactococcus lactis* using the P170 expression system. *FEMS Microbiol Lett* (2014) **351**(2):170-8. doi: 10.1111/1574-6968.12351
11. Morello E, Bermudez-Humaran LG, Llull D, Sole V, Miraglio N, Langella P, Poquet I. *Lactococcus lactis*, an efficient cell factory for recombinant protein production and secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* (2008) **14**(1-3):48-58. doi: 10.1159/000106082
12. Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermudez-Humaran LG, Nouaille S, Ribeiro LA, Leclercq S, Gabriel JE, Guimaraes VD, Oliveira MN, Charlier C, Gautier M, Langella P. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microb Cell Fact* (2005) **4**(1):2. doi: 10.1186/1475-2859-4-2
13. Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* (2005) **68**(6):705-17. doi: 10.1007/s00253-005-0107-6
14. Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* (2001) **11**(5):731-53. doi: 10.1101/gr.169701
15. Wegmann U, O'Connell-Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson MJ, Kuipers OP, van Sinderen D, Kok J. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* (2007) **189**(8):3256-70. doi: 10.1128/jb.01768-06
16. Wells JM, Wilson PW, Le Page RW. Improved cloning vectors and transformation procedure for *Lactococcus lactis*. *J Appl Bacteriol* (1993) **74**(6):629-36.
17. Holo H, Nes IF. High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl Environ Microbiol* (1989) **55**(12):3119-23.
18. Kullen MJ, Klaenhammer TR. Genetic modification of intestinal lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol* (2000) **2**(2):41-50.
19. Wyszynska A, Kobierecka P, Bardowski J, Jagusztyn-Krynicka EK. Lactic acid bacteria--20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl Microbiol Biotechnol* (2015) **99**(7):2967-77. doi: 10.1007/s00253-015-6498-0
20. Hanson ML, Hixon JA, Li W, Felber BK, Anver MR, Stewart CA, Janelisins BM, Datta SK, Shen W, McLean MH, Durum SK. Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. *Gastroenterology* (2014) **146**(1):210-21.e13. doi: 10.1053/j.gastro.2013.09.060
21. Huibregtse IL, Marietta EV, Rashtak S, Koning F, Rottiers P, David CS, van Deventer SJ, Murray

- JA. Induction of antigen-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* delivered immunodominant DQ8-restricted gliadin peptide in sensitized nonobese diabetic Abo Dq8 transgenic mice. *J Immunol* (2009) **183**(4):2390-6. doi: 10.4049/jimmunol.0802891
22. Huibregtse IL, Snoeck V, de Creus A, Braat H, De Jong EC, Van Deventer SJ, Rottiers P. Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of *Lactococcus lactis* secreting ovalbumin. *Gastroenterology* (2007) **133**(2):517-28. doi: 10.1053/j.gastro.2007.04.073
23. Robert S, Gysemans C, Takiishi T, Korf H, Spagnuolo I, Sebastiani G, Van Huynegem K, Steidler L, Caluwaerts S, Demetter P, Wasserfall CH, Atkinson MA, Dotta F, Rottiers P, Van Belle TL, Mathieu C. Oral delivery of glutamic acid decarboxylase (GAD)-65 and IL10 by *Lactococcus lactis* reverses diabetes in recent-onset NOD mice. *Diabetes* (2014) **63**(8):2876-87. doi: 10.2337/db13-1236
24. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neirynck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* (2000) **289**(5483):1352-5.
25. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, Le Page RW, Wells JM. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* (1998) **66**(7):3183-9.
26. Takiishi T, Korf H, Van Belle TL, Robert S, Grieco FA, Caluwaerts S, Galleri L, Spagnuolo I, Steidler L, Van Huynegem K, Demetter P, Wasserfall C, Atkinson MA, Dotta F, Rottiers P, Gysemans C, Mathieu C. Reversal of autoimmune diabetes by restoration of antigen-specific tolerance using genetically modified *Lactococcus lactis* in mice. *J Clin Invest* (2012) **122**(5):1717-25. doi: 10.1172/jci60530
27. Vandenbroucke K, de Haard H, Beirnaert E, Dreier T, Lauwereys M, Huyck L, Van Huysse J, Demetter P, Steidler L, Remaut E, Cuvelier C, Rottiers P. Orally administered *L. lactis* secreting an anti-TNF Nanobody demonstrate efficacy in chronic colitis. *Mucosal Immunol* (2010) **3**(1):49-56. doi: 10.1038/mi.2009.116
28. Benbouziane B, Ribelles P, Aubry C, Martin R, Kharrat P, Riazi A, Langella P, Bermudez-Humaran LG. Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *J Biotechnol* (2013) **168**(2):120-9. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.04.019
29. de Vos WM, Kuipers OP, van der Meer JR, Siezen RJ. Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* (1995) **17**(3):427-37.
30. Islam MR, Nagao J, Zendo T, Sonomoto K. Antimicrobial mechanism of lantibiotics. *Biochem Soc Trans* (2012) **40**(6):1528-33. doi: 10.1042/bst20120190
31. Kuipers OP, Beerthuyzen MM, de Ruyter PG, Luesink EJ, de Vos WM. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. *J Biol Chem* (1995) **270**(45):27299-304.
32. de Ruyter PG, Kuipers OP, de Vos WM. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol* (1996) **62**(10):3662-7.
33. Mierau I, Olieman K, Mond J, Smid EJ. Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microb Cell Fact* (2005) **4**:16. doi: 10.1186/1475-2859-4-16
34. Michon C, Langella P, Eijsink VG, Mathiesen G, Chatel JM. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microb Cell Fact* (2016) **15**:70. doi: 10.1186/s12934-016-0468-9
35. Le Loir Y, Nouaille S, Commissaire J, Bretigny L, Gruss A, Langella P. Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* (2001) **67**(9):4119-27.
36. Ribeiro LA, Azevedo V, Le Loir Y, Oliveira SC, Dieye Y, Piard JC, Gruss A, Langella P. Production and targeting of the Brucella abortus antigen L7/L12 in *Lactococcus lactis*: a first step towards food-grade live vaccines against brucellosis. *Appl Environ Microbiol* (2002) **68**(2):910-6.
37. Poquet I, Saint V, Sez nec E, Simoes N, Bolotin A, Gruss A. HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol Microbiol* (2000) **35**(5):1042-51.
38. Nilsson D, Lauridsen AA, Tomoyasu T, Ogura T. A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* *ftsH* gene product. *Microbiology* (1994) **140**(10):2601-10. doi: 10.1099/00221287-140-10-2601
39. Frees D, Ingmer H. ClpP participates in the degradation of misfolded protein in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* (1999) **31**(1):79-87.

40. de Vos WM, Vos P, de Haard H, Boerrigter I. Cloning and expression of the *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 gene encoding an extracellular serine proteinase. *Gene* (1989) **85**(1):169-76.
41. Miyoshi A, Poquet I, Azevedo V, Commissaire J, Bermudez-Humaran L, Domakova E, Le Loir Y, Oliveira SC, Gruss A, Langella P. Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* (2002) **68**(6):3141-6.
42. 清野宏, 石川博通, 名倉宏. 粘膜免疫 腸は免疫の司令塔. 東京, 日本: 中山書店 (2001).
43. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat Med* (2005) **11**(4 Suppl):S45-53. doi: 10.1038/nm1213
44. 重盛駿. 免疫活性を有する GFP 融合食物アレルギータンパク質を産生する乳酸菌組換え体の構築とリコンビナントタンパク質の部位選択的発現システムの確立. 信州大学大学院農学研究科修士学位論文 (2014).
45. Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Sugita-Konishi Y, Aibara K, Koga T. Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun* (1990) **58**(9):2929-34.
46. Robinson K, Chamberlain LM, Schofield KM, Wells JM, Le Page RW. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. *Nat Biotechnol* (1997) **15**(7):653-7. doi: 10.1038/nbt0797-653
47. Norton PM, Wells JM, Brown HW, Macpherson AM, Le Page RW. Protection against tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* (1997) **15**(6-7):616-9.
48. Robinson K, Chamberlain LM, Lopez MC, Rush CM, Marcotte H, Le Page RW, Wells JM. Mucosal and cellular immune responses elicited by recombinant *Lactococcus lactis* strains expressing tetanus toxin fragment C. *Infect Immun* (2004) **72**(5):2753-61.
49. Reveneau N, Geoffroy MC, Loch C, Chagnaud P, Mercenier A. Comparison of the immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* (2002) **20**(13-14):1769-77.
50. Norton PM, Brown HW, Wells JM, Macpherson AM, Wilson PW, Le Page RW. Factors affecting the immunogenicity of tetanus toxin fragment C expressed in *Lactococcus lactis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* (1996) **14**(2-3):167-77.
51. Medaglini D, Ciabattini A, Spinosa MR, Maggi T, Marcotte H, Oggioni MR, Pozzi G. Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. *Vaccine* (2001) **19**(15-16):1931-9.
52. Grangette C, Muller-Alouf H, Hols P, Goudercourt D, Delcour J, Turneer M, Mercenier A. Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infect Immun* (2004) **72**(5):2731-7.
53. Grangette C, Muller-Alouf H, Goudercourt D, Geoffroy MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* (2001) **69**(3):1547-53. doi: 10.1128/iai.69.3.1547-1553.2001
54. Grangette C, Muller-Alouf H, Geoffroy M, Goudercourt D, Turneer M, Mercenier A. Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine* (2002) **20**(27-28):3304-9.
55. Hanniffy SB, Carter AT, Hitchin E, Wells JM. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *J Infect Dis* (2007) **195**(2):185-93. doi: 10.1086/509807
56. Mohamadzadeh M, Duong T, Sandwick SJ, Hoover T, Klaenhammer TR. Dendritic cell targeting of *Bacillus anthracis* protective antigen expressed by *Lactobacillus acidophilus* protects mice from lethal challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**(11):4331-6. doi: 10.1073/pnas.0900029106
57. Yoon SW, Lee TY, Kim SJ, Lee IH, Sung MH, Park JS, Poo H. Oral administration of HPV-16 L2 displayed on *Lactobacillus casei* induces systematic and mucosal cross-neutralizing effects in Balb/c mice. *Vaccine* (2012) **30**(22):3286-94. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.009
58. Taguchi A, Kawana K, Yokoyama T, Adachi K, Yamashita A, Tomio K, Kojima S, Oda K, Fujii T, Kozuma S. Adjuvant effect of Japanese herbal medicines on the mucosal type 1 immune responses to human papillomavirus (HPV) E7 in mice immunized orally with *Lactobacillus*-based therapeutic HPV vaccine in a synergistic manner. *Vaccine* (2012) **30**(36):5368-72. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.027
59. Poo H, Pyo HM, Lee TY, Yoon SW, Lee JS, Kim CJ, Sung MH, Lee SH. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7-specific antitumor effects in C57/BL6 mice. *Int J Cancer* (2006) **119**(7):1702-9. doi: 10.1002/ijc.22035
60. Lee TY, Kim YH, Lee KS, Kim JK, Lee IH, Yang JM, Sung MH, Park JS, Poo H. Human papillomavirus

type 16 E6-specific antitumor immunity is induced by oral administration of HPV16 E6-expressing *Lactobacillus casei* in C57BL/6 mice. *Cancer Immunol Immunother* (2010) **59**(11):1727-37. doi: 10.1007/s00262-010-0903-4

61. Kawana K, Adachi K, Kojima S, Taguchi A, Tomio K, Yamashita A, Nishida H, Nagasaka K, Arimoto T, Yokoyama T, Wada-Hiraike O, Oda K, Sewaki T, Osuga Y, Fujii T. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine* (2014) **32**(47):6233-9. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.09.020

62. Adachi K, Kawana K, Yokoyama T, Fujii T, Tomio A, Miura S, Tomio K, Kojima S, Oda K, Sewaki T, Yasugi T, Kozuma S, Taketani Y. Oral immunization with a *Lactobacillus casei* vaccine expressing human papillomavirus (HPV) type 16 E7 is an effective strategy to induce mucosal cytotoxic lymphocytes against HPV16 E7. *Vaccine* (2010) **28**(16):2810-7. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.005

63. Rangel-Colmenero BR, Gomez-Gutierrez JG, Villatoro-Hernandez J, Zavala-Flores LM, Quistian-Martinez D, Rojas-Martinez A, Arce-Mendoza AY, Guzman-Lopez S, Montes-de-Oca-Luna R, Saucedo-Cardenas O. Enhancement of Ad-CRT/E7-mediated antitumor effect by preimmunization with *L. lactis* expressing HPV-16 E7. *Viral Immunol* (2014) **27**(9):463-7. doi: 10.1089/vim.2014.0055

64. Cortes-Perez NG, Bermudez-Humaran LG, Le Loir Y, Rodriguez-Padilla C, Gruss A, Saucedo-Cardenas O, Langella P, Montes-de-Oca-Luna R. Mice immunization with live lactococci displaying a surface anchored HPV-16 E7 oncoprotein. *FEMS Microbiol Lett* (2003) **229**(1):37-42.

65. Cho HJ, Shin HJ, Han IK, Jung WW, Kim YB, Sul D, Oh YK. Induction of mucosal and systemic immune responses following oral immunization of mice with *Lactococcus lactis* expressing human papillomavirus type 16 L1. *Vaccine* (2007) **25**(47):8049-57. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.09.024

66. Bermudez-Humaran LG, Langella P, Cortes-Perez NG, Gruss A, Tamez-Guerra RS, Oliveira SC, Saucedo-Cardenas O, Montes de Oca-Luna R, Le Loir Y. Intranasal immunization with recombinant *Lactococcus lactis* secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect Immun* (2003) **71**(4):1887-96.

67. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Lefevre F, Guimaraes V, Rabot S, Alcocer-Gonzalez JM, Gratadoux JJ, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra RS, Corthier G, Gruss A, Langella P. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *J Immunol* (2005) **175**(11):7297-302.

68. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Le Loir Y, Alcocer-Gonzalez JM, Tamez-Guerra RS, de Oca-Luna RM, Langella P. An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. *J Med Microbiol* (2004) **53**(5):427-33. doi: 10.1099/jmm.0.05472-0

69. Bermudez-Humaran LG, Cortes-Perez NG, Ah-Leung S, Lefevre F, Yang G, Pang Q, Wu C, Zeng Y, Adel-Patient K, Langella P. Current prophylactic and therapeutic uses of a recombinant *Lactococcus lactis* strain secreting biologically active interleukin-12. *J Mol Microbiol Biotechnol* (2008) **14**(1-3):80-9. doi: 10.1159/000106086

70. Almeida JF, Breyner NM, Mahi M, Ahmed B, Benbouziane B, Boas PC, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Bermudez-Humaran LG, Chatel JM. Expression of fibronectin binding protein A (FnBPA) from *Staphylococcus aureus* at the cell surface of *Lactococcus lactis* improves its immunomodulatory properties when used as protein delivery vector. *Vaccine* (2016) **34**(10):1312-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.01.022

71. Hongying F, Xianbo W, Fang Y, Yang B, Beiguo L. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus acidophilus* expressing the adhesin Hp0410 of *Helicobacter pylori* induces mucosal and systemic immune responses. *Clin Vaccine Immunol* (2014) **21**(2):126-32. doi: 10.1128/cvi.00434-13

72. Corthesy B, Boris S, Isler P, Grangette C, Mercenier A. Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. *J Infect Dis* (2005) **192**(8):1441-9. doi: 10.1086/444425

73. Zhang R, Peng X, Duan G, Shi Q, Chen S, Wang C, Fan Q, Xi Y. An engineered *Lactococcus lactis* strain exerts significant immune responses through efficient expression and delivery of *Helicobacter pylori* Lpp20 antigen. *Biotechnol Lett* (2016) **38**(12):2169-75. doi: 10.1007/s10529-016-2209-x

74. Zhang R, Duan G, Shi Q, Chen S, Fan Q, Sun N, Xi Y. Construction of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing a fusion protein of Omp22 and HpaA from *Helicobacter pylori* for oral vaccine development. *Biotechnol Lett* (2016) **38**(11):1911-6. doi: 10.1007/s10529-016-2173-5

75. Zhang HX, Qiu YY, Zhao YH, Liu XT, Liu M, Yu AL. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. *Mol Cell Probes* (2014) **28**(1):25-30. doi: 10.1016/j.mcp.2013.08.003

76. Li X, Xing Y, Guo L, Lv X, Song H, Xi T. Oral immunization with recombinant *Lactococcus lactis* delivering a multi-epitope antigen CTB-UE attenuates *Helicobacter pylori* infection in mice. *Pathog Dis* (2014) **72**(1):78-86. doi: 10.1111/2049-632x.12173
77. Lee MH, Roussel Y, Wilks M, Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine* (2001) **19**(28-29):3927-35.
78. Kim SJ, Lee JY, Jun DY, Song JY, Lee WK, Cho MJ, Kim YH. Oral administration of *Lactococcus lactis* expressing *Helicobacter pylori* Cag7-ct383 protein induces systemic anti-Cag7 immune response in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2009) **57**(3):257-68. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00605.x
79. Kim SJ, Jun DY, Yang CH, Kim YH. Expression of *Helicobacter pylori* cag12 gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its oral administration to induce systemic anti-Cag12 immune response in mice. *Appl Microbiol Biotechnol* (2006) **72**(3):462-70. doi: 10.1007/s00253-005-0285-2
80. Gu Q, Song D, Zhu M. Oral vaccination of mice against *Helicobacter pylori* with recombinant *Lactococcus lactis* expressing urease subunit B. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2009) **56**(3):197-203. doi: 10.1111/j.1574-695X.2009.00566.x
81. Yang WT, Shi SH, Yang GL, Jiang YL, Zhao L, Li Y, Wang CF. Cross-protective efficacy of dendritic cells targeting conserved influenza virus antigen expressed by *Lactobacillus plantarum*. *Sci Rep* (2016) **6**:39665. doi: 10.1038/srep39665
82. Wang Z, Yu Q, Gao J, Yang Q. Mucosal and systemic immune responses induced by recombinant *Lactobacillus* spp. expressing the hemagglutinin of the avian influenza virus H5N1. *Clin Vaccine Immunol* (2012) **19**(2):174-9. doi: 10.1128/cvi.05618-11
83. Wang Z, Yu Q, Fu J, Liang J, Yang Q. Immune responses of chickens inoculated with recombinant *Lactobacillus* expressing the haemagglutinin of the avian influenza virus. *J Appl Microbiol* (2013) **115**(6):1269-77. doi: 10.1111/jam.12325
84. Shi SH, Yang WT, Yang GL, Zhang XK, Liu YY, Zhang LJ, Ye LP, Hu JT, Xing X, Qi C, Li Y, Wang CF. *Lactobacillus plantarum* vaccine vector expressing hemagglutinin provides protection against H9N2 challenge infection. *Virus Res* (2016) **211**:46-57. doi: 10.1016/j.virusres.2015.09.005
85. Shi SH, Yang WT, Yang GL, Cong YL, Huang HB, Wang Q, Cai RP, Ye LP, Hu JT, Zhou JY, Wang CF, Li Y. Immunoprotection against influenza virus H9N2 by the oral administration of recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 expressing hemagglutinin in BALB/c mice. *Virology* (2014) **464-465**:166-76. doi: 10.1016/j.virol.2014.07.011
86. Li R, Chowdhury MY, Kim JH, Kim TH, Pathinayake P, Koo WS, Park ME, Yoon JE, Roh JB, Hong SP, Sung MH, Lee JS, Kim CJ. Mucosally administered *Lactobacillus* surface-displayed influenza antigens (sM2 and HA2) with cholera toxin subunit A1 (CTA1) Induce broadly protective immune responses against divergent influenza subtypes. *Vet Microbiol* (2015) **179**(3-4):250-63. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.020
87. Chowdhury MY, Li R, Kim JH, Park ME, Kim TH, Pathinayake P, Weeratunga P, Song MK, Son HY, Hong SP, Sung MH, Lee JS, Kim CJ. Mucosal vaccination with recombinant *Lactobacillus casei*-displayed CTA1-conjugated consensus matrix protein-2 (sM2) induces broad protection against divergent influenza subtypes in BALB/c mice. *PLoS One* (2014) **9**(4):e94051. doi: 10.1371/journal.pone.0094051
88. Wang Z, Gao J, Yu Q, Yang Q. Oral immunization with recombinant *Lactococcus lactis* expressing the hemagglutinin of the avian influenza virus induces mucosal and systemic immune responses. *Future Microbiol* (2012) **7**(8):1003-10. doi: 10.2217/fmb.12.69
89. Reese KA, Lupfer C, Johnson RC, Mitev GM, Mullen VM, Geller BL, Pastey M. A Novel Lactococcal Vaccine Expressing a Peptide from the M2 Antigen of H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus Prolongs Survival of Vaccinated Chickens. *Vet Med Int* (2013) **2013**:316926. doi: 10.1155/2013/316926
90. Lei H, Sheng Z, Ding Q, Chen J, Wei X, Lam DM, Xu Y. Evaluation of oral immunization with recombinant avian influenza virus HA1 displayed on the *Lactococcus lactis* surface and combined with the mucosal adjuvant cholera toxin subunit B. *Clin Vaccine Immunol* (2011) **18**(7):1046-51. doi: 10.1128/cvi.00050-11
91. Lei H, Peng X, Zhao D, Ouyang J, Jiao H, Shu H, Ge X. *Lactococcus lactis* displayed neuraminidase confers cross protective immunity against influenza A viruses in mice. *Virology* (2015) **476**:189-95. doi: 10.1016/j.virol.2014.12.017
92. Lei H, Peng X, Zhao D, Jiao H, Ouyang J. Cross-protection of *Lactococcus lactis*-displayed HA2 subunit against homologous and heterologous influenza A viruses in mice. *Arch Virol* (2015) **160**(12):3011-9. doi: 10.1007/s00705-015-2587-8
93. Lei H, Peng X, Shu H, Zhao D. Intranasal immunization with live recombinant *Lactococcus lactis* combined with heat-labile toxin B subunit protects chickens from highly pathogenic avian influenza H5N1 virus.

94. Lei H, Peng X, Ouyang J, Zhao D, Jiao H, Shu H, Ge X. Intranasal immunization of recombinant *Lactococcus lactis* induces protection against H5N1 virus in ferrets. *Virus Res* (2015) **196**:56-9. doi: 10.1016/j.virusres.2014.11.009
95. Lei H, Peng X, Ouyang J, Zhao D, Jiao H, Shu H, Ge X. Protective immunity against influenza H5N1 virus challenge in chickens by oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing neuraminidase. *BMC Vet Res* (2015) **11**:85. doi: 10.1186/s12917-015-0399-4
96. Lei H, Peng X, Jiao H, Zhao D, Ouyang J. Broadly protective immunity against divergent influenza viruses by oral co-administration of *Lactococcus lactis* expressing nucleoprotein adjuvanted with cholera toxin B subunit in mice. *Microb Cell Fact* (2015) **14**:111. doi: 10.1186/s12934-015-0287-4
97. Joan SS, Pui-Fong J, Song AA, Chang LY, Yusoff K, AbuBakar S, Rahim RA. Oral vaccine of *Lactococcus lactis* harbouring pandemic H1N1 2009 haemagglutinin1 and nisP anchor fusion protein elevates anti-HA1 sIgA levels in mice. *Biotechnol Lett* (2016) **38**(5):793-9. doi: 10.1007/s10529-016-2034-2
98. Kuczkowska K, Mathiesen G, Eijssink VG, Oynebraten I. *Lactobacillus plantarum* displaying CCL3 chemokine in fusion with HIV-1 Gag derived antigen causes increased recruitment of T cells. *Microb Cell Fact* (2015) **14**:169. doi: 10.1186/s12934-015-0360-z
99. Kajikawa A, Zhang L, Long J, Nordone S, Stoeker L, LaVoy A, Bumgardner S, Klaenhammer T, Dean G. Construction and immunological evaluation of dual cell surface display of HIV-1 gag and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FliC in *Lactobacillus acidophilus* for vaccine delivery. *Clin Vaccine Immunol* (2012) **19**(9):1374-81. doi: 10.1128/cvi.00049-12
100. Kajikawa A, Zhang L, LaVoy A, Bumgardner S, Klaenhammer TR, Dean GA. Mucosal Immunogenicity of Genetically Modified *Lactobacillus acidophilus* Expressing an HIV-1 Epitope within the Surface Layer Protein. *PLoS One* (2015) **10**(10):e0141713. doi: 10.1371/journal.pone.0141713
101. Xin KQ, Hoshino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N, Ohba K, Kushi A, Kiwaki M, Hamajima K, Klinman D, Okuda K. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Blood* (2003) **102**(1):223-8. doi: 10.1182/blood-2003-01-0110
102. Chamcha V, Jones A, Quigley BR, Scott JR, Amara RR. Oral Immunization with a Recombinant *Lactococcus lactis*-Expressing HIV-1 Antigen on Group A Streptococcus Pilus Induces Strong Mucosal Immunity in the Gut. *J Immunol* (2015) **195**(10):5025-34. doi: 10.4049/jimmunol.1501243
103. Oliveira ML, Areas AP, Campos IB, Monedero V, Perez-Martinez G, Miyaji EN, Leite LC, Aires KA, Lee Ho P. Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in *Streptococcus pneumoniae* colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. *Microbes Infect* (2006) **8**(4):1016-24. doi: 10.1016/j.micinf.2005.10.020
104. Hernani Mde L, Ferreira PC, Ferreira DM, Miyaji EN, Ho PL, Oliveira ML. Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the pneumococcal surface protein C primes the immune system and decreases pneumococcal nasopharyngeal colonization in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2011) **62**(3):263-72. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00809.x
105. Ferreira DM, Darrieux M, Silva DA, Leite LC, Ferreira JM, Jr., Ho PL, Miyaji EN, Oliveira ML. Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by pneumococcal surface protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. *Clin Vaccine Immunol* (2009) **16**(5):636-45. doi: 10.1128/cvi.00395-08
106. Campos IB, Darrieux M, Ferreira DM, Miyaji EN, Silva DA, Areas AP, Aires KA, Leite LC, Ho PL, Oliveira ML. Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the Pneumococcal Surface Protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. *Microbes Infect* (2008) **10**(5):481-8. doi: 10.1016/j.micinf.2008.01.007
107. Vintini E, Villena J, Alvarez S, Medina M. Administration of a probiotic associated with nasal vaccination with inactivated *Lactococcus lactis*-PppA induces effective protection against pneumococcal infection in young mice. *Clin Exp Immunol* (2010) **159**(3):351-62. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.04056.x
108. Villena J, Medina M, Vintini E, Alvarez S. Stimulation of respiratory immunity by oral administration of *Lactococcus lactis*. *Can J Microbiol* (2008) **54**(8):630-8. doi: 10.1139/w08-052
109. Villena J, Medina M, Raya R, Alvarez S. Oral immunization with recombinant *Lactococcus lactis* confers protection against respiratory pneumococcal infection. *Can J Microbiol* (2008) **54**(10):845-53. doi: 10.1139/w08-077
110. Villena J, Medina M, Racedo S, Alvarez S. Resistance of young mice to pneumococcal infection can be improved by oral vaccination with recombinant *Lactococcus lactis*. *J Microbiol Immunol Infect* (2010) **43**(1):1-10. doi: 10.1016/s1684-1182(10)60001-1
111. Medina M, Villena J, Vintini E, Hebert EM, Raya R, Alvarez S. Nasal immunization with *Lactococcus*

- lactis* expressing the pneumococcal protective protein A induces protective immunity in mice. *Infect Immun* (2008) **76**(6):2696-705. doi: 10.1128/iai.00119-08
112. Fukutomi Y, Nakamura H, Kobayashi F, Taniguchi M, Konno S, Nishimura M, Kawagishi Y, Watanabe J, Komase Y, Akamatsu Y, Okada C, Tanimoto Y, Takahashi K, Kimura T, Eboshida A, Hirota R, Ikei J, Odajima H, Nakagawa T, Akasawa A, Akiyama K. Nationwide cross-sectional population-based study on the prevalences of asthma and asthma symptoms among Japanese adults. *Int Arch Allergy Immunol* (2010) **153**(3):280-7. doi: 10.1159/000314369
 113. Holgate ST. The epidemic of allergy and asthma. *Nature* (1999) **402**(6760):2-4.
 114. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* (2009) **124**(6):1549-55. doi: 10.1542/peds.2009-1210
 115. Wang J, Sampson HA. Oral and sublingual immunotherapy for food allergy. *Asian Pac J Allergy Immunol* (2013) **31**(3):198-209.
 116. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* (2005) **206**:232-59. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00280.x
 117. Chaillous L, Lefevre H, Thivolet C, Boitard C, Lahlou N, Atlan-Gepner C, Bouhanick B, Mogenet A, Nicolino M, Carel JC, Lecomte P, Marechaud R, Bougneres P, Charbonnel B, Sai P. Oral insulin administration and residual beta-cell function in recent-onset type 1 diabetes: a multicentre randomised controlled trial. Diabete Insuline Orale group. *Lancet* (2000) **356**(9229):545-9.
 118. de Azevedo MS, Innocentin S, Dorella FA, Rocha CS, Mariat D, Pontes DS, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Chatel JM. Immunotherapy of allergic diseases using probiotics or recombinant probiotics. *J Appl Microbiol* (2013) **115**(2):319-33. doi: 10.1111/jam.12174
 119. Robert S, Steidler L. Recombinant *Lactococcus lactis* can make the difference in antigen-specific immune tolerance induction, the Type 1 Diabetes case. *Microb Cell Fact* (2014) **13**(Suppl 1):S11. doi: 10.1186/1475-2859-13-s1-s11
 120. Frossard CP, Steidler L, Eigenmann PA. Oral administration of an IL-10-secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food-induced IgE sensitization. *J Allergy Clin Immunol* (2007) **119**(4):952-9. doi: 10.1016/j.jaci.2006.12.615
 121. Marinho FA, Pacifico LG, Miyoshi A, Azevedo V, Le Loir Y, Guimaraes VD, Langella P, Cassali GD, Fonseca CT, Oliveira SC. An intranasal administration of *Lactococcus lactis* strains expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model. *Clin Exp Allergy* (2010) **40**(10):1541-51. doi: 10.1111/j.1365-2222.2010.03502.x
 122. Ai C, Zhang Q, Ren C, Wang G, Liu X, Tian F, Zhao J, Zhang H, Chen YQ, Chen W. Genetically engineered *Lactococcus lactis* protect against house dust mite allergy in a BALB/c mouse model. *PLoS One* (2014) **9**(10):e109461. doi: 10.1371/journal.pone.0109461
 123. Liu KF, Liu XR, Li GL, Lu SP, Jin L, Wu J. Oral administration of *Lactococcus lactis*-expressing heat shock protein 65 and tandemly repeated IA2P2 prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Immunol Lett* (2016) **174**:28-36. doi: 10.1016/j.imlet.2016.04.008
 124. Ma Y, Liu J, Hou J, Dong Y, Lu Y, Jin L, Cao R, Li T, Wu J. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing HSP65 and tandemly repeated P277 reduces the incidence of type I diabetes in non-obese diabetic mice. *PLoS One* (2014) **9**(8):e105701. doi: 10.1371/journal.pone.0105701
 125. Rezende RM, Oliveira RP, Medeiros SR, Gomes-Santos AC, Alves AC, Loli FG, Guimaraes MA, Amaral SS, da Cunha AP, Weiner HL, Azevedo V, Miyoshi A, Faria AM. Hsp65-producing *Lactococcus lactis* prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in mice by inducing CD4+LAP+ regulatory T cells. *J Autoimmun* (2013) **40**:45-57. doi: 10.1016/j.jaut.2012.07.012
 126. Adel-Patient K, Ah-Leung S, Creminon C, Nouaille S, Chatel JM, Langella P, Wal JM. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine β -lactoglobulin partially prevents mice from sensitization. *Clin Exp Allergy* (2005) **35**(4):539-46. doi: 10.1111/j.1365-2222.2005.02225.x
 127. Cortes-Perez NG, Ah-Leung S, Bermudez-Humaran LG, Corthier G, Wal JM, Langella P, Adel-Patient K. Intranasal coadministration of live lactococci producing interleukin-12 and a major cow's milk allergen inhibits allergic reaction in mice. *Clin Vaccine Immunol* (2007) **14**(3):226-33. doi: 10.1128/cvi.00299-06
 128. Daniel C, Repa A, Wild C, Pollak A, Pot B, Breiteneder H, Wiedermann U, Mercenier A. Modulation of allergic immune responses by mucosal application of recombinant lactic acid bacteria producing the major birch pollen allergen Bet v 1. *Allergy* (2006) **61**(7):812-9. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01071.x
 129. Ren C, Zhang Q, Wang G, Ai C, Hu M, Liu X, Tian F, Zhao J, Chen Y, Wang M, Zhang H, Chen W. Modulation of peanut-induced allergic immune responses by oral lactic acid bacteria-based vaccines in mice. *Appl Microbiol Biotechnol* (2014) **98**(14):6353-64. doi: 10.1007/s00253-014-5678-7

130. Chatel JM, Langella P, Adel-Patient K, Commissaire J, Wal JM, Corthier G. Induction of mucosal immune response after intranasal or oral inoculation of mice with *Lactococcus lactis* producing bovine β -lactoglobulin. *Clin Diagn Lab Immunol* (2001) **8**(3):545-51. doi: 10.1128/cdli.8.3.545-551.2001
131. Hazebrouck S, Pothelune L, Azevedo V, Corthier G, Wal JM, Langella P. Efficient production and secretion of bovine β -lactoglobulin by *Lactobacillus casei*. *Microb Cell Fact* (2007) **6**:12. doi: 10.1186/1475-2859-6-12
132. Hazebrouck S, Przybylski-Nicaise L, Ah-Leung S, Adel-Patient K, Corthier G, Langella P, Wal JM. Influence of the route of administration on immunomodulatory properties of bovine β -lactoglobulin-producing *Lactobacillus casei*. *Vaccine* (2009) **27**(42):5800-5. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.07.064
133. Shigemori S, Yonekura S, Sato T, Nakanishi M, Otani H, Shimosato T. Expression of a biologically active GFP- α_{s1} -casein fusion protein in *Lactococcus lactis*. *Curr Microbiol* (2012) **64**(6):569-75. doi: 10.1007/s00284-012-0111-x
134. Shigemori S, Yonekura S, Sato T, Otani H, Shimosato T. Expression of the immunoreactive buckwheat major allergenic storage protein in *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* (2013) **97**(8):3603-11. doi: 10.1007/s00253-012-4608-9
135. Kruisselbrink A, Heijne Den Bak-Glashouwer MJ, Havenith CE, Thole JE, Janssen R. Recombinant *Lactobacillus plantarum* inhibits house dust mite-specific T-cell responses. *Clin Exp Immunol* (2001) **126**(1):2-8.
136. Rigaux P, Daniel C, Hisbergues M, Muraille E, Hols P, Pot B, Pestel J, Jacquet A. Immunomodulatory properties of *Lactobacillus plantarum* and its use as a recombinant vaccine against mite allergy. *Allergy* (2009) **64**(3):406-14. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01825.x
137. Charng YC, Lin CC, Hsu CH. Inhibition of allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity by recombinant lactic-acid bacteria. *Vaccine* (2006) **24**(33-34):5931-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.07.107
138. Ohkouchi K, Kawamoto S, Tatsugawa K, Yoshikawa N, Takaoka Y, Miyauchi S, Aki T, Yamashita M, Murooka Y, Ono K. Prophylactic effect of *Lactobacillus* oral vaccine expressing a Japanese cedar pollen allergen. *J Biosci Bioeng* (2012) **113**(4):536-41. doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.11.025
139. Schwarzer M, Repa A, Daniel C, Schabussova I, Hrnčir T, Pot B, Stepankova R, Hudcovic T, Pollak A, Tlaskalova-Hogenova H, Wiedermann U, Kozakova H. Neonatal colonization of mice with *Lactobacillus plantarum* producing the aeroallergen Bet v 1 biases towards Th1 and T-regulatory responses upon systemic sensitization. *Allergy* (2011) **66**(3):368-75. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02488.x
140. de Moreno de LeBlanc A, Del Carmen S, Chatel JM, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, Bermudez-Humaran LG, LeBlanc JG. Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. *Gastroenterol Res Pract* (2015) **2015**:146972. doi: 10.1155/2015/146972
141. Shigemori S, Shimosato T. Applications of genetically modified immunobiotics with high immunoregulatory capacity for treatment of inflammatory bowel diseases. *Front Immunol* (2017). **8**:22. doi: 10.3389/fimmu.2017.00022
142. Beninati C, Oggioni MR, Boccanera M, Spinosa MR, Maggi T, Conti S, Magliani W, De Bernardis F, Teti G, Cassone A, Pozzi G, Polonelli L. Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* (2000) **18**(10):1060-4. doi: 10.1038/80250
143. Kruger C, Hu Y, Pan Q, Marcotte H, Hultberg A, Delwar D, van Dalen PJ, Pouwels PH, Leer RJ, Kelly CG, van Dollenweerd C, Ma JK, Hammarstrom L. In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol* (2002) **20**(7):702-6. doi: 10.1038/nbt0702-702
144. Pant N, Hultberg A, Zhao Y, Svensson L, Pan-Hammarstrom Q, Johansen K, Pouwels PH, Ruggeri FM, Hermans P, Frenken L, Boren T, Marcotte H, Hammarstrom L. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. *J Infect Dis* (2006) **194**(11):1580-8. doi: 10.1086/508747
145. Andersen KK, Marcotte H, Alvarez B, Boyaka PN, Hammarstrom L. In situ gastrointestinal protection against anthrax edema toxin by single-chain antibody fragment producing lactobacilli. *BMC Biotechnol* (2011) **11**:126. doi: 10.1186/1472-6750-11-126
146. Hoang PM, Cho S, Kim KE, Byun SJ, Lee TK, Lee S. Development of *Lactobacillus paracasei* harboring nucleic acid-hydrolyzing 3D8 scFv as a preventive probiotic against murine norovirus infection. *Appl Microbiol Biotechnol* (2015) **99**(6):2793-803. doi: 10.1007/s00253-014-6257-7
147. Chancey CJ, Khanna KV, Seegers JF, Zhang GW, Hildreth J, Langan A, Markham RB. Lactobacilli-expressed single-chain variable fragment (scFv) specific for intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) blocks cell-associated HIV-1 transmission across a cervical epithelial monolayer. *J Immunol* (2006) **176**(9):5627-36.
148. Marcobal A, Liu X, Zhang W, Dimitrov AS, Jia L, Lee PP, Fouts TR, Parks TP, Lagenaur LA.

Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Neutralizing Antibody Fragments Using Human Vaginal *Lactobacillus*. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2016) **32**(10-11):964-71. doi: 10.1089/aid.2015.0378

149. Bermudez-Humaran LG, Nouaille S, Zilberfarb V, Corthier G, Gruss A, Langella P, Issad T. Effects of intranasal administration of a leptin-secreting *Lactococcus lactis* recombinant on food intake, body weight, and immune response of mice. *Appl Environ Microbiol* (2007) **73**(16):5300-7. doi: 10.1128/aem.00295-07

150. Chang TL, Chang CH, Simpson DA, Xu Q, Martin PK, Lagenaur LA, Schoolnik GK, Ho DD, Hillier SL, Holodniy M, Lewicki JA, Lee PP. Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**(20):11672-7. doi: 10.1073/pnas.1934747100

151. Lagenaur LA, Sanders-Beer BE, Brichacek B, Pal R, Liu X, Liu Y, Yu R, Venzon D, Lee PP, Hamer DH. Prevention of vaginal SHIV transmission in macaques by a live recombinant *Lactobacillus*. *Mucosal Immunol* (2011) **4**(6):648-57. doi: 10.1038/mi.2011.30

152. Liu X, Lagenaur LA, Simpson DA, Essenmacher KP, Frazier-Parker CL, Liu Y, Tsai D, Rao SS, Hamer DH, Parks TP, Lee PP, Xu Q. Engineered vaginal *lactobacillus* strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrob Agents Chemother* (2006) **50**(10):3250-9. doi: 10.1128/aac.00493-06

153. Vangelista L, Secchi M, Liu X, Bachi A, Jia L, Xu Q, Lusso P. Engineering of *Lactobacillus jensenii* to secrete RANTES and a CCR5 antagonist analogue as live HIV-1 blockers. *Antimicrob Agents Chemother* (2010) **54**(7):2994-3001. doi: 10.1128/aac.01492-09

154. Xiao X, Zhang C, Liu D, Bai W, Zhang Q, Xiang Q, Huang Y, Su Z. Prevention of gastrointestinal lead poisoning using recombinant *Lactococcus lactis* expressing human metallothionein-I fusion protein. *Sci Rep* (2016) **6**:23716. doi: 10.1038/srep23716

155. Agarwal P, Khatri P, Billack B, Low WK, Shao J. Oral delivery of glucagon like peptide-1 by a recombinant *Lactococcus lactis*. *Pharm Res* (2014) **31**(12):3404-14. doi: 10.1007/s11095-014-1430-3

156. Ng DT, Sarkar CA. Nisin-inducible secretion of a biologically active single-chain insulin analog by *Lactococcus lactis* NZ9000. *Biotechnol Bioeng* (2011) **108**(8):1987-96. doi: 10.1002/bit.23130

157. Wang D, Xu S, Lin Y, Fang Z, Che L, Xue B, Wu D. Recombinant porcine epidermal growth factor-secreting *Lactococcus lactis* promotes the growth performance of early-weaned piglets. *BMC Vet Res* (2014) **10**:171. doi: 10.1186/s12917-014-0171-1

158. Kang P, Toms D, Yin Y, Cheung Q, Gong J, De Lange K, Li J. Epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* enhances intestinal development of early-weaned pigs. *J Nutr* (2010) **140**(4):806-11. doi: 10.3945/jn.109.114173

159. Cheung QC, Yuan Z, Dyce PW, Wu D, DeLange K, Li J. Generation of epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* and its enhancement on intestinal development and growth of early-weaned mice. *Am J Clin Nutr* (2009) **89**(3):871-9. doi: 10.3945/ajcn.2008.27073

160. Bedford A, Li Z, Li M, Ji S, Liu W, Huai Y, de Lange CF, Li J. Epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* enhances growth performance of early-weaned pigs fed diets devoid of blood plasma. *J Anim Sci* (2012) **90**(Suppl 4):4-6. doi: 10.2527/jas.53973

161. Bedford A, Huynh E, Fu M, Zhu C, Wey D, de Lange C, Li J. Growth performance of early-weaned pigs is enhanced by feeding epidermal growth factor-expressing *Lactococcus lactis* fermentation product. *J Biotechnol* (2014) **173**:47-52. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.01.012

162. Bedford A, Chen T, Huynh E, Zhu C, Medeiros S, Wey D, de Lange C, Li J. Epidermal growth factor containing culture supernatant enhances intestine development of early-weaned pigs in vivo: potential mechanisms involved. *J Biotechnol* (2015) **196-197**:9-19. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.01.007

163. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* (2012) **142**(1):46-54. doi: 10.1053/j.gastro.2011.10.001

164. Bernstein C, Eliakim A, Fedail S, Fried M, Gearry R, Goh KL, Hamid S, Khan AG, Khalif I, Ng SC, Ouyang Q, Rey JF, Sood A, Steinwurz F, Watermeyer G, LeMair A. *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Inflammatory Bowel Disease*: World Gastroenterology Organisation (2015).

165. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2016) **13**(1):13-27. doi: 10.1038/nrgastro.2015.186

166. Rutgeerts P, Van Assche G, Vermeire S. Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease--seven years on. *Aliment Pharmacol Ther* (2006) **23**(4):451-63. doi: 10.1111/j.1365-2036.2006.02786.x

167. Zenlea T, Peppercorn MA. Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* (2014) **20**(12):3146-52. doi: 10.3748/wjg.v20.i12.3146
168. Del Carmen S, de Moreno de LeBlanc A, Martin R, Chain F, Langella P, Bermudez-Humaran LG, LeBlanc JG. Genetically engineered immunomodulatory *Streptococcus thermophilus* strains producing antioxidant enzymes exhibit enhanced anti-inflammatory activities. *Appl Environ Microbiol* (2014) **80**(3):869-77. doi: 10.1128/aem.03296-13
169. Steidler L, Neirynck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, Cox E, Remon JP, Remaut E. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol* (2003) **21**(7):785-9. doi: 10.1038/nbt840
170. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neirynck S, Peppelenbosch MP, Steidler L. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2006) **4**(6):754-9. doi: 10.1016/j.cgh.2006.03.028
171. Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* (2008) **60**(1):79-127. doi: 10.1124/pr.107.07104
172. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **338**(1):558-67. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.020
173. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. *J Clin Biochem Nutr* (2011) **48**(2):126-33. doi: 10.3164/jcgn.10-61
174. Takagi T, Naito Y, Uchiyama K, Yoshikawa T. The role of heme oxygenase and carbon monoxide in inflammatory bowel disease. *Redox Rep* (2010) **15**(5):193-201. doi: 10.1179/174329210x12650506623889
175. Naito Y, Takagi T, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* (2004) **20**(Suppl 1):177-84. doi: 10.1111/j.1365-2036.2004.01992.x
176. Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN, Cho CH. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2001) **281**(2):G586-94.
177. Berberat PO, Yi AR, Yamashita K, Warny MM, Csizmadia E, Robson SC, Bach FH. Heme oxygenase-1-generated biliverdin ameliorates experimental murine colitis. *Inflamm Bowel Dis* (2005) **11**(4):350-9.
178. Erbil Y, Giris M, Abbasoglu SD, Barbaros U, Yanik BT, Necefli A, Olgac V, Toker GA. Effect of heme oxygenase-1 induction by octreotide on TNBS-induced colitis. *J Gastroenterol Hepatol* (2007) **22**(11):1852-8. doi: 10.1111/j.1440-1746.2007.04838.x
179. Giris M, Erbil Y, Dogru-Abbasoglu S, Yanik BT, Alis H, Olgac V, Toker GA. The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on TNBS-induced colitis. The effect of glutamine on TNBS colitis. *Int J Colorectal Dis* (2007) **22**(6):591-9. doi: 10.1007/s00384-006-0238-y
180. Hegazi RA, Rao KN, Mayle A, Sepulveda AR, Otterbein LE, Plevy SE. Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway. *J Exp Med* (2005) **202**(12):1703-13. doi: 10.1084/jem.20051047
181. Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hirai Y, Harusato A, Ohnogi H, Yamaji R, Inui H, Nakano Y, Yoshikawa T. Oligosaccharides from agar inhibit murine intestinal inflammation through the induction of heme oxygenase-1 expression. *J Gastroenterol* (2013) **48**(8):897-909. doi: 10.1007/s00535-012-0719-4
182. Onyiah JC, Sheikh SZ, Maharshak N, Steinbach EC, Russo SM, Kobayashi T, Mackey LC, Hansen JJ, Moeser AJ, Rawls JF, Borst LB, Otterbein LE, Plevy SE. Carbon monoxide and heme oxygenase-1 prevent intestinal inflammation in mice by promoting bacterial clearance. *Gastroenterology* (2013) **144**(4):789-98. doi: 10.1053/j.gastro.2012.12.025
183. Sheikh SZ, Hegazi RA, Kobayashi T, Onyiah JC, Russo SM, Matsuoka K, Sepulveda AR, Li F, Otterbein LE, Plevy SE. An anti-inflammatory role for carbon monoxide and heme oxygenase-1 in chronic Th2-mediated murine colitis. *J Immunol* (2011) **186**(9):5506-13. doi: 10.4049/jimmunol.1002433
184. Sun X, Suzuki K, Nagata M, Kawauchi Y, Yano M, Ohkoshi S, Matsuda Y, Kawachi H, Watanabe K, Asakura H, Aoyagi Y. Rectal administration of tranilast ameliorated acute colitis in mice through increased expression of heme oxygenase-1. *Pathol Int* (2010) **60**(2):93-101. doi: 10.1111/j.1440-1827.2009.02490.x
185. Varga C, Laszlo F, Fritz P, Cavicchi M, Lamarque D, Horvath K, Posa A, Berko A, Whittle BJ. Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat. *Eur J Pharmacol* (2007) **561**(1-3):164-71. doi: 10.1016/j.ejphar.2006.12.022
186. Yukitake H, Kimura H, Suzuki H, Tajima Y, Sato Y, Imaeda T, Kajino M, Takizawa M. BTZO-15, an ARE-activator, ameliorates DSS- and TNBS-induced colitis in rats. *PLoS One* (2011) **6**(8):e23256. doi:

187. Zhang L, Zhang Y, Zhong W, Di C, Lin X, Xia Z. Heme oxygenase-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute murine colitis by regulating Th17/Treg cell balance. *J Biol Chem* (2014) **289**(39):26847-58. doi: 10.1074/jbc.M114.590554
188. Zhong W, Xia Z, Hinrichs D, Rosenbaum JT, Wegmann KW, Meyrowitz J, Zhang Z. Hemin exerts multiple protective mechanisms and attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2010) **50**(2):132-9. doi: 10.1097/MPG.0b013e3181c61591
189. Bermudez-Humaran LG, Motta JP, Aubry C, Kharrat P, Rous-Martin L, Sallenave JM, Deraison C, Vergnolle N, Langella P. Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF- β anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb Cell Fact* (2015) **14**:26. doi: 10.1186/s12934-015-0198-4
190. Foligne B, Dessein R, Marceau M, Poiret S, Chamaillard M, Pot B, Simonet M, Daniel C. Prevention and treatment of colitis with *Lactococcus lactis* secreting the immunomodulatory *Yersinia* LcrV protein. *Gastroenterology* (2007) **133**(3):862-74. doi: 10.1053/j.gastro.2007.06.018
191. Waeytens A, Ferdinande L, Neiryck S, Rottiers P, De Vos M, Steidler L, Cuvelier CA. Paracellular entry of interleukin-10 producing *Lactococcus lactis* in inflamed intestinal mucosa in mice. *Inflamm Bowel Dis* (2008) **14**(4):471-9. doi: 10.1002/ibd.20346
192. del Carmen S, Martin Rosique R, Saraiva T, Zurita-Turk M, Miyoshi A, Azevedo V, de Moreno de LeBlanc A, Langella P, Bermudez-Humaran LG, LeBlanc JG. Protective effects of lactococci strains delivering either IL-10 protein or cDNA in a TNBS-induced chronic colitis model. *J Clin Gastroenterol* (2014) **48** Suppl 1:S12-7. doi: 10.1097/mcg.0000000000000235
193. Quevrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermudez-Humaran LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill JP, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P. Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* (2016) **65**(3):415-25. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307649
194. Aubry C, Michon C, Chain F, Chvatchenko Y, Goffin L, Zimmerli SC, Leguin S, Langella P, Bermudez-Humaran L, Chatel JM. Protective effect of TSLP delivered at the gut mucosa level by recombinant lactic acid bacteria in DSS-induced colitis mouse model. *Microb Cell Fact* (2015) **14**:176. doi: 10.1186/s12934-015-0367-5
195. Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryck S, Demetter P, Remaut E, Rottiers P, Steidler L. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* (2004) **127**(2):502-13.
196. Saraiva TD, Morais K, Pereira VB, de Azevedo M, Rocha CS, Prosperi CC, Gomes-Santos AC, Bermudez-Humaran L, Faria AM, Blottiere HM, Langella P, Miyoshi A, de LeBlanc Ade M, LeBlanc JG, Azevedo V. Milk fermented with a 15-lipoxygenase-1-producing *Lactococcus lactis* alleviates symptoms of colitis in a murine model. *Curr Pharm Biotechnol* (2015) **16**(5):424-9.
197. Wong CC, Zhang L, Wu WK, Shen J, Chan RL, Lu L, Hu W, Li MX, Li LF, Ren SX, Li YF, Li J, Cho CH. Cathelicidin-Encoding *Lactococcus lactis* Promotes Mucosal Repair in Murine Experimental Colitis. *J Gastroenterol Hepatol* (2016). doi: 10.1111/jgh.13499
198. Wong CC, Zhang L, Li ZJ, Wu WK, Ren SX, Chen YC, Ng TB, Cho CH. Protective effects of cathelicidin-encoding *Lactococcus lactis* in murine ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* (2012) **27**(7):1205-12. doi: 10.1111/j.1440-1746.2012.07158.x
199. Motta JP, Bermudez-Humaran LG, Deraison C, Martin L, Rolland C, Rousset P, Boue J, Dietrich G, Chapman K, Kharrat P, Vinel JP, Alric L, Mas E, Sallenave JM, Langella P, Vergnolle N. Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci Transl Med* (2012) **4**(158):158ra44. doi: 10.1126/scitranslmed.3004212
200. Liu S, Li Y, Deng B, Xu Z. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine insulin-like growth factor I ameliorates DSS-induced colitis in mice. *BMC Biotechnol* (2016) **16**:25. doi: 10.1186/s12896-016-0255-z
201. Han W, Mercenier A, Ait-Belgnaoui A, Pavan S, Lamine F, van S, II, Kleerebezem M, Salvador-Cartier C, Hisbergues M, Bueno L, Theodorou V, Fioramonti J. Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflamm Bowel Dis* (2006) **12**(11):1044-52. doi: 10.1097/01.mib.0000235101.09231.9e
202. LeBlanc JG, del Carmen S, Miyoshi A, Azevedo V, Sesma F, Langella P, Bermudez-Humaran LG, Watterlot L, Perdigon G, de Moreno de LeBlanc A. Use of superoxide dismutase and catalase producing lactic acid bacteria in TNBS induced Crohn's disease in mice. *J Biotechnol* (2011) **151**(3):287-93. doi:

203. Rochat T, Bermudez-Humaran L, Gratadoux JJ, Fourage C, Hoebler C, Corthier G, Langella P. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb Cell Fact* (2007) **6**:22. doi: 10.1186/1475-2859-6-22
204. Watterlot L, Rochat T, Sokol H, Cherbuy C, Bouloufa I, Lefevre F, Gratadoux JJ, Honvo-Hueto E, Chilmonczyk S, Blugeon S, Corthier G, Langella P, Bermudez-Humaran LG. Intragastric administration of a superoxide dismutase-producing recombinant *Lactobacillus casei* BL23 strain attenuates DSS colitis in mice. *Int J Food Microbiol* (2010) **144**(1):35-41. doi: 10.1016/j.jfoodmicro.2010.03.037
205. Yoon SW, Lee CH, Kim JY, Kim JY, Sung MH, Poo H. *Lactobacillus casei* secreting α -MSH induces the therapeutic effect on DSS-induced acute colitis in Balb/c Mice. *J Microbiol Biotechnol* (2008) **18**(12):1975-83.
206. Qiu ZB, Chen J, Chen JJ, Rong L, Ding WQ, Yang HJ, Zhong L. Effect of recombinant *Lactobacillus casei* expressing interleukin-10 in dextran sulfate sodium-induced colitis mice. *J Dig Dis* (2013) **14**(2):76-83. doi: 10.1111/1751-2980.12006
207. Zhang J, Liu H, Wang Q, Hou C, Thacker P, Qiao S. Expression of catalase in *Lactobacillus fermentum* and evaluation of its anti-oxidative properties in a dextran sodium sulfate induced mouse colitis model. *World J Microbiol Biotechnol* (2013) **29**(12):2293-301. doi: 10.1007/s11274-013-1395-0
208. Hou CL, Zhang J, Liu XT, Liu H, Zeng XF, Qiao SY. Superoxide dismutase recombinant *Lactobacillus fermentum* ameliorates intestinal oxidative stress through inhibiting NF- κ B activation in a trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis mouse model. *J Appl Microbiol* (2014) **116**(6):1621-31. doi: 10.1111/jam.12461
209. Carroll IM, Andrus JM, Bruno-Barcena JM, Klaenhammer TR, Hassan HM, Threadgill DS. Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007) **293**(4):G729-38. doi: 10.1152/ajpgi.00132.2007
210. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory (2001).
211. Shigemori S, Oshiro K, Wang P, Yamamoto Y, Wang Y, Sato T, Uyeno Y, Shimosato T. Generation of dipeptidyl peptidase-IV-inhibiting peptides from β -lactoglobulin secreted by *Lactococcus lactis*. *Biomed Res Int* (2014) **2014**:393598. doi: 10.1155/2014/393598
212. Yoshida T, Kikuchi G. Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal heme oxygenase system. *J Biol Chem* (1978) **253**(12):4230-6.
213. Wang Y, Yamamoto Y, Shigemori S, Watanabe T, Oshiro K, Wang X, Wang P, Sato T, Yonekura S, Tanaka S, Kitazawa H, Shimosato T. Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice. *Mol Ther* (2015) **23**(2):297-309. doi: 10.1038/mt.2014.239
214. Watanabe T, Nishimura K, Monir MM, Takemoto C, Hiramatsu K. Immunoelectron microscopic observation of chicken glucagon-like peptide (GLP)-1-containing cells in tissues derived from thin section, paraffin block and conventional method. *J Vet Med Sci* (2014) **76**(3):389-94.
215. Siegmund B, Lehr HA, Fantuzzi G. Leptin: a pivotal mediator of intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* (2002) **122**(7):2011-25.
216. Shigemori S, Watanabe T, Kudoh K, Ihara M, Nigar S, Yamamoto Y, Suda Y, Sato T, Kitazawa H, Shimosato T. Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice. *Microb Cell Fact* (2015) **14**:189. doi: 10.1186/s12934-015-0378-2
217. Pu ZY, Dobos M, Limsowtin GK, Powell IB. Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *J Appl Microbiol* (2002) **93**(2):353-61.
218. van Asseldonk M, de Vos WM, Simons G. Functional analysis of the *Lactococcus lactis* usp45 secretion signal in the secretion of a homologous proteinase and a heterologous α -amylase. *Mol Gen Genet* (1993) **240**(3):428-34.
219. Yoshida T, Migita CT. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem* (2000) **82**(1-4):33-41.
220. Zhang X, Fujii H, Matera KM, Migita CT, Sun D, Sato M, Ikeda-Saito M, Yoshida T. Stereoselectivity of each of the three steps of the heme oxygenase reaction: heme to meso-hydroxyheme, meso-hydroxyheme to verdoheme, and verdoheme to biliverdin. *Biochemistry* (2003) **42**(24):7418-26. doi: 10.1021/bi027173g
221. Yoshinaga T, Sudo Y, Sano S. Enzymic conversion of α -oxyprotohaem IX into biliverdin IX α by haem oxygenase. *Biochem J* (1990) **270**(3):659-64.

222. Yoshida T, Noguchi M, Kikuchi G, Sano S. Degradation of mesoheme and hydroxymesoheme catalyzed by the heme oxygenase system: involvement of hydroxyheme in the sequence of heme catabolism. *J Biochem* (1981) **90**(1):125-31.
223. Yoshida T, Noguchi M, Kikuchi G. Oxygenated form of heme . heme oxygenase complex and requirement for second electron to initiate heme degradation from the oxygenated complex. *J Biol Chem* (1980) **255**(10):4418-20.
224. Wilks A, Ortiz de Montellano PR. Rat liver heme oxygenase. High level expression of a truncated soluble form and nature of the meso-hydroxylating species. *J Biol Chem* (1993) **268**(30):22357-62.
225. Matera KM, Takahashi S, Fujii H, Zhou H, Ishikawa K, Yoshimura T, Rousseau DL, Yoshida T, Ikeda-Saito M. Oxygen and one reducing equivalent are both required for the conversion of α -hydroxyhemin to verdoheme in heme oxygenase. *J Biol Chem* (1996) **271**(12):6618-24.
226. Liu Y, Ortiz de Montellano PR. Reaction intermediates and single turnover rate constants for the oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J Biol Chem* (2000) **275**(8):5297-307.
227. Liu Y, Moenne-Loccoz P, Loehr TM, Ortiz de Montellano PR. Heme oxygenase-1, intermediates in verdoheme formation and the requirement for reduction equivalents. *J Biol Chem* (1997) **272**(11):6909-17.
228. Yoshida T, Kikuchi G. Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *J Biol Chem* (1978) **253**(12):4224-9.
229. Shigemori S, Ihara M, Sato T, Yamamoto Y, Nigar S, Ogita T, Shimosato T. Secretion of an immunoreactive single-chain variable fragment antibody against mouse interleukin 6 by *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* (2017) **101**(1):341-9. doi: 10.1007/s00253-016-7907-8
230. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WJ. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD. *J Vis Exp* (2012) (60). doi: 10.3791/3678
231. Wirtz S, Neufert C, Weigmann B, Neurath MF. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nat Protoc* (2007) **2**(3):541-6. doi: 10.1038/nprot.2007.41
232. Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* (1993) **69**(2):238-49.
233. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* (1984) **87**(6):1344-50.
234. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol* (2014) **104**: 15.25.1-15.25.14. doi: 10.1002/0471142735.im1525s104
235. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* (1990) **98**(3):694-702.
236. Brusko TM, Wasserfall CH, Agarwal A, Kapturczak MH, Atkinson MA. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* (2005) **174**(9):5181-6.
237. Shouval DS, Ouahed J, Biswas A, Goettel JA, Horwitz BH, Klein C, Muise AM, Snapper SB. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Adv Immunol* (2014) **122**:177-210. doi: 10.1016/b978-0-12-800267-4.00005-5
238. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, Mathew CG, Schreiber S. Sequence variants in *IL10*, *ARPC2* and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet* (2008) **40**(11):1319-23. doi: 10.1038/ng.221
239. Amre DK, Mack DR, Morgan K, Israel D, Lambrette P, Costea I, Krupoves A, Fegury H, Dong J, Grimard G, Deslandres C, Levy E, Seidman EG. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* (2009) **29**(9):1025-31. doi: 10.1111/j.1365-2036.2009.03953.x
240. Aithal GP, Craggs A, Day CP, Welfare M, Daly AK, Mansfield JC, Hudson M. Role of polymorphisms in the interleukin-10 gene in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* (2001) **46**(7):1520-5.
241. Spencer SD, Di Marco F, Hooley J, Pitts-Meek S, Bauer M, Ryan AM, Sordat B, Gibbs VC, Aguet M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J Exp Med* (1998) **187**(4):571-8.
242. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic

enterocolitis. *Cell* (1993) **75**(2):263-74.

243. Ricchetti GA, Williams LM, Foxwell BM. Heme oxygenase 1 expression induced by IL-10 requires STAT-3 and phosphoinositol-3 kinase and is inhibited by lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol* (2004) **76**(3):719-26. doi: 10.1189/jlb.0104046

244. Drechsler Y, Dolganiuc A, Norkina O, Romics L, Li W, Kodys K, Bach FH, Mandrekar P, Szabo G. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of acute alcohol on IL-10 induction involving p38 MAPK activation in monocytes. *J Immunol* (2006) **177**(4):2592-600.

245. Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* (2002) **8**(3):240-6. doi: 10.1038/nm0302-240

246. Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Boyle P, Jaffe R, Upperman J, Zamora R, Ford HR. Carbon monoxide protects against the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2005) **289**(3):607-13. doi: 10.1152/ajpgi.00055.2005

247. George JF, Braun A, Brusko TM, Joseph R, Bolisetty S, Wasserfall CH, Atkinson MA, Agarwal A, Kapturczak MH. Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *Am J Pathol* (2008) **173**(1):154-60. doi: 10.2353/ajpath.2008.070963

248. Abraham C, Cho J. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* (2009) **15**(7):1090-100. doi: 10.1002/ibd.20894

249. Siakavellas SI, Bamias G. Role of the IL-23/IL-17 axis in Crohn's disease. *Discov Med* (2012) **14**(77):253-62.

250. Jun CD, Kim Y, Choi EY, Kim M, Park B, Youn B, Yu K, Choi KS, Yoon KH, Choi SC, Lee MS, Park KI, Choi M, Chung Y, Oh J. Gliotoxin reduces the severity of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice: evidence of the connection between heme oxygenase-1 and the nuclear factor- κ B pathway in vitro and in vivo. *Inflamm Bowel Dis* (2006) **12**(7):619-29. doi: 10.1097/01.ibd.0000225340.99108.8a

251. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* (2015) **16**(5):448-57. doi: 10.1038/ni.3153

252. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* (2005) **23**:1-21. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806

253. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2014) **6**(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295

254. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* (2003) **374**(1):1-20. doi: 10.1042/bj20030407

255. Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, Hirabayashi T, Yoneda Y, Tanaka K, Wang WZ, Mori C, Shiota K, Yoshida N, Kishimoto T. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) **93**(1):407-11.

256. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* (1990) **63**(6):1149-57.

257. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* (2011) **121**(9):3375-83. doi: 10.1172/jci57158

258. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* (1993) **82**(4):1120-6.

259. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* (1997) **15**:797-819. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.797

260. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* (1990) **265**(3):621-36.

261. Tanaka T, Kishimoto T. Immunotherapy of tocilizumab for rheumatoid arthritis. *J Clin Cell Immunol* (2011) **S6**:001. doi: 10.4172/2155-9899.S6-001

262. De Benedetti F, Brunner HI, Ruperto N, Kenwright A, Wright S, Calvo I, Cuttica R, Ravelli A, Schneider R, Woo P, Wouters C, Xavier R, Zemel L, Baildam E, Burgos-Vargas R, Dolezalova P, Garay SM, Merino R, Joos R, Grom A, Wulffraat N, Zuber Z, Zulian F, Lovell D, Martini A. Randomized trial of tocilizumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N Engl J Med* (2012) **367**(25):2385-95. doi: 10.1056/NEJMoa1112802

263. Yokota S, Imagawa T, Mori M, Miyamae T, Aihara Y, Takei S, Iwata N, Umebayashi H, Murata T, Miyoshi M, Tomiita M, Nishimoto N, Kishimoto T. Efficacy and safety of tocilizumab in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, withdrawal phase III trial.

Lancet (2008) **371**(9617):998-1006. doi: 10.1016/s0140-6736(08)60454-7

264. Katsume A, Saito H, Yamada Y, Yoroazu K, Ueda O, Akamatsu K, Nishimoto N, Kishimoto T, Yoshizaki K, Ohsugi Y. Anti-interleukin 6 (IL-6) receptor antibody suppresses Castleman's disease like symptoms emerged in IL-6 transgenic mice. *Cytokine* (2002) **20**(6):304-11.
265. Nishimoto N, Kanakura Y, Aozasa K, Johkoh T, Nakamura M, Nakano S, Nakano N, Ikeda Y, Sasaki T, Nishioka K, Hara M, Taguchi H, Kimura Y, Kato Y, Asaoku H, Kumagai S, Kodama F, Nakahara H, Hagihara K, Yoshizaki K, Kishimoto T. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood* (2005) **106**(8):2627-32. doi: 10.1182/blood-2004-12-4602
266. van Rhee F, Wong RS, Munshi N, Rossi JF, Ke XY, Fossa A, Simpson D, Capra M, Liu T, Hsieh RK, Goh YT, Zhu J, Cho SG, Ren H, Cavet J, Bandekar R, Rothman M, Puchalski TA, Reddy M, van de Velde H, Vermeulen J, Casper C. Siltuximab for multicentric Castleman's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* (2014) **15**(9):966-74. doi: 10.1016/s1470-2045(14)70319-5
267. Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH, Daruwalla J, Tackey E, Takada K, Fleisher T, Balow JE, Lipsky PE. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum* (2010) **62**(2):542-52. doi: 10.1002/art.27221
268. Shirota Y, Yarboro C, Fischer R, Pham TH, Lipsky P, Illei GG. Impact of anti-interleukin-6 receptor blockade on circulating T and B cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* (2013) **72**(1):118-28. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201310
269. Szepletowski JC, Nilganuwong S, Wozniacka A, Kuhn A, Nyberg F, van Vollenhoven RF, Bengtsson AA, Reich A, de Vries DE, van Hartingsveldt B, Robinson DW, Jr., Gordon R, Hsu B. Phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple intravenous, dose-ascending study of sirukumab in cutaneous or systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* (2013) **65**(10):2661-71. doi: 10.1002/art.38091
270. Kitaba S, Murota H, Terao M, Azukizawa H, Terabe F, Shima Y, Fujimoto M, Tanaka T, Naka T, Kishimoto T, Katayama I. Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma. *Am J Pathol* (2012) **180**(1):165-76. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.09.013
271. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* (2000) **6**(5):583-8. doi: 10.1038/75068
272. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, Andoh A, Matsumoto T, Yamamura T, Azuma J, Nishimoto N, Yoshizaki K, Shimoyama T, Kishimoto T. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* (2004) **126**(4):989-96.
273. Chu DK, Al-Garawi A, Llop-Guevara A, Pillai RA, Radford K, Shen P, Walker TD, Goncharova S, Calhoun WJ, Nair P, Jordana M. Therapeutic potential of anti-IL-6 therapies for granulocytic airway inflammation in asthma. *Allergy Asthma Clin Immunol* (2015) **11**(1):14. doi: 10.1186/s13223-015-0081-1
274. Smolen JS, Weinblatt ME, Sheng S, Zhuang Y, Hsu B. Sirukumab, a human anti-interleukin-6 monoclonal antibody: a randomised, 2-part (proof-of-concept and dose-finding), phase II study in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy. *Ann Rheum Dis* (2014) **73**(9):1616-25. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-205137
275. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow M. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* (1988) **242**(4877):423-6.
276. Villarejo MR, Zabin I. Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J Bacteriol* (1974) **120**(1):466-74.
277. 仲西真耶. 食物アレルギーを産生する微生物組み換え体の構築. 信州大学農学部食料生産科学科学士学位論文 (2011).
278. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* (2012) **9**(7):671-5.
279. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol* (1978) **31**(6):507-20.
280. Yuvaraj S, Al-Lahham S, Marreddy RK, Dijkstra G, Wolken WA, Lolkema JS, Helfrich W, Johansen FE, Peppelenbosch MP, Bos NA. Human scFv SIgA expressed on *Lactococcus lactis* as a vector for the treatment of mucosal disease. *Mol Nutr Food Res* (2008) **52**(8):913-20. doi: 10.1002/mnfr.200700132
281. Gross E, Morell JL. The structure of nisin. *J Am Chem Soc* (1971) **93**(18):4634-5.
282. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat*

Biotechnol (2005) **23**(9):1126-36. doi: 10.1038/nbt1142

283. Rincon M, Irvin CG. Role of IL-6 in asthma and other inflammatory pulmonary diseases. *Int J Biol Sci* (2012) **8**(9):1281-90. doi: 10.7150/ijbs.4874
284. Waldner MJ, Neurath MF. Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Semin Immunol* (2014) **26**(1):75-9. doi: 10.1016/j.smim.2013.12.003
285. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* (2009) **9**(11):798-809. doi: 10.1038/nrc2734
286. Song L, Smith MA, Doshi P, Sasser K, Fulp W, Altiock S, Haura EB. Antitumor efficacy of the anti-interleukin-6 (IL-6) antibody siltuximab in mouse xenograft models of lung cancer. *J Thorac Oncol* (2014) **9**(7):974-82. doi: 10.1097/jto.0000000000000193
287. Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Ito H. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis. *J Immunol* (2000) **164**(9):4878-82.
288. Hernandez-Ledesma B, Recio I, Amigo L. β -lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids* (2008) **35**(2):257-65. doi: 10.1007/s00726-007-0585-1
289. Kontopidis G, Holt C, Sawyer L. Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci* (2004) **87**(4):785-96. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1
290. 上野川修一, 菅野長右エ門, 細野明義. ミルクのサイエンス : ミルクの新しい働き. 東京, 日本: 全国農協乳業プラント協会 (1998).
291. Timasheff S, Townend R. Structure of the β -Lactoglobulin Tetramer. *Nature* (1964) **203**:517-9.
292. Dalgarrondo M, Chobert J, Dufour E, Bertrand-Harb C, Dumont J, Haertle T. Characterization of bovine β -lactoglobulin B tryptic peptides by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Milchwissenschaft* (1990) **45**:212-6.
293. Selo I, Clement G, Bernard H, Chatel J, Creminon C, Peltre G, Wal J. Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin Exp Allergy* (1999) **29**(8):1055-63.
294. Keet CA, Frischmeyer-Guerrero PA, Thyagarajan A, Schroeder JT, Hamilton RG, Boden S, Steele P, Driggers S, Burks AW, Wood RA. The safety and efficacy of sublingual and oral immunotherapy for milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* (2012) **129**(2):448-55. doi: 10.1016/j.jaci.2011.10.023
295. Brandelli A, Daroit D, Correa A. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International* (2015) **73**:149-61.
296. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides* (2013) **39**:157-63. doi: 10.1016/j.peptides.2012.11.016
297. Lacroix IM, Li-Chan EC. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides* (2014) **54**:39-48. doi: 10.1016/j.peptides.2014.01.002
298. Lacroix IM, Li-Chan EC. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and alpha-glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. *J Agric Food Chem* (2013) **61**(31):7500-6. doi: 10.1021/jf401000s
299. Silveira ST, Martinez-Maqueda D, Recio I, Hernandez-Ledesma B. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β -lactoglobulin. *Food Chem* (2013) **141**(2):1072-7. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.056
300. Uchida M, Ohshiba Y, Mogami O. Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from β -lactoglobulin. *J Pharmacol Sci* (2011) **117**(1):63-6.
301. Thoma R, Loffler B, Stihle M, Huber W, Ruf A, Hennig M. Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Structure* (2003) **11**(8):947-59.
302. Phillips LK, Prins JB. Update on incretin hormones. *Ann N Y Acad Sci* (2011) **1243**:55-74. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06491.x
303. Cortes-Perez NG, Ah-Leung S, Bermudez-Humaran LG, Corthier G, Langella P, Wal JM, Adel-Patient K. Allergy therapy by intranasal administration with recombinant *Lactococcus lactis* Producing bovine β -lactoglobulin. *Int Arch Allergy Immunol* (2009) **150**(1):25-31. doi: 10.1159/000210377
304. Hernandez-Ledesma B, Davalos A, Bartolome B, Amigo L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J Agric Food Chem* (2005) **53**(3):588-93. doi: 10.1021/jf048626m
305. Contreras M, Hernandez-Ledesma B, Amigo L, Martin-Alvarez P, Recio I. Production of antioxidant hydrolysates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT-Food Sci Technol* (2011) **44**:9-15.

306. Power O, Fernandez A, Norris R, Riera F, FitzGerald RJ. Selective enrichment of bioactive properties during ultrafiltration of a tryptic digest of β -lactoglobulin. *J Funct Foods* (2014) **9**:38-47.
307. Zhang QX, Wu H, Ling YF, Lu RR. Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *J Dairy Res* (2013) **80**(3):367-73. doi: 10.1017/S0022029913000320
308. Pihlanto-Leppala A, Rokka T, Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int Dairy J* (1998) **8**:325-31.
309. Abubakar A, Saito T, Kitazawa H, Kawai Y, Itoh T. Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J Dairy Sci* (1998) **81**(12):3131-8. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75878-3
310. Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Synthetic peptides corresponding to α -lactalbumin and β -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Biol Chem Hoppe Seyler* (1996) **377**(4):259-60.
311. Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Lett* (1997) **402**(2-3):99-101.
312. Pihlanto-Leppala A, Koskinen P, Piilola K, Tupasela T, Korhonen H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J Dairy Res* (2000) **67**(1):53-64.
313. Tavares T, Contreras Mdel M, Amorim M, Pintado M, Recio I, Malcata FX. Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: in vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides* (2011) **32**(5):1013-9. doi: 10.1016/j.peptides.2011.02.005
314. Tavares T, Monteiro K, Possenti A, Pintado M, Carvalho JE, Malcata FX. Antiulcerogenic activity of peptide concentrates obtained from hydrolysis of whey proteins by proteases from *Cynara cardunculus*. *Int Dairy J* (2011) **21**:934-9.
315. Pan D, Guo Y. Optimization of sour milk fermentation for the production of ACE-inhibitory peptides and purification of a novel peptide from whey protein hydrolysate. *Int Dairy J* (2010) **20**:472-9.
316. Demers-Mathieu V, Gauthier SF, Britten M, Fliss I, Robitaille G, Jean J. Antibacterial activity of peptides extracted from tryptic hydrolyzate of whey protein by nanofiltration. *Int Dairy J* (2013) **28**:94-101.
317. Theolier J, Hammami R, Labelle P, Fliss I, Jean J. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *J Funct Foods* (2013) **5**:706-14.
318. Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta* (2001) **1526**(2):131-40.
319. Tulipano G, Sibilia V, Caroli AM, Cocchi D. Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides* (2011) **32**(4):835-8. doi: 10.1016/j.peptides.2011.01.002
320. Nagaoka S, Futamura Y, Miwa K, Awano T, Yamauchi K, Kanamaru Y, Tadashi K, Kuwata T. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) **281**(1):11-7. doi: 10.1006/bbrc.2001.4298
321. Antila P, Paakkari I, Jarvinen A, Mattila MJ, Laukkanen M, Pihlanto-Leppala A, Mantsala P, Hellman J. Opioid peptides derived from in-vitro proteolysis of bovine whey proteins. *Int Dairy J* (1991) **1**:215-29.
322. Sipola M, Finckenberg P, Vapaatalo H, Pihlanto-Leppala A, Korhonen H, Korpela R, Nurminen ML. α -lactorphan and β -lactorphan improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* (2002) **71**(11):1245-53.
323. Yamauchi R, Ohinata K, Yoshikawa M. Beta-lactotensin and neurotensin rapidly reduce serum cholesterol via NT2 receptor. *Peptides* (2003) **24**(12):1955-61.
324. Yamauchi R, Usui H, Yunden J, Takenaka Y, Tani F, Yoshikawa M. Characterization of β -lactotensin, a bioactive peptide derived from bovine β -lactoglobulin, as a neurotensin agonist. *Biosci Biotechnol Biochem* (2003) **67**(4):940-3.
325. Nguyen TH, Casale TB. Immune modulation for treatment of allergic disease. *Immunol Rev* (2011) **242**(1):258-71. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01034.x
326. Caluwaerts S, Vandenbroucke K, Steidler L, Neirynck S, Vanhoenacker P, Corveleyn S, Watkins B, Sonis S, Coulie B, Rottiers P. AG013, a mouth rinse formulation of *Lactococcus lactis* secreting human Trefoil Factor 1, provides a safe and efficacious therapeutic tool for treating oral mucositis. *Oral Oncol* (2010) **46**(7):564-70. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.04.008
327. Rovner AJ, Haimovich AD, Katz SR, Li Z, Grome MW, Gassaway BM, Amiram M, Patel JR, Gallagher RR, Rinehart J, Isaacs FJ. Recoded organisms engineered to depend on synthetic amino acids. *Nature* (2015)

518(7537):89-93. doi: 10.1038/nature14095

328. Mandell DJ, Lajoie MJ, Mee MT, Takeuchi R, Kuznetsov G, Norville JE, Gregg CJ, Stoddard BL, Church GM. Biocontainment of genetically modified organisms by synthetic protein design. *Nature* (2015) **518**(7537):55-60. doi: 10.1038/nature14121

329. de Moreno de LeBlanc A, Del Carmen S, Chatel JM, Azevedo V, Langella P, Bermudez-Humaran L, LeBlanc JG. Evaluation of the biosafety of recombinant lactic acid bacteria designed to prevent and treat colitis. *J Med Microbiol* (2016) **65**(9):1038-46. doi: 10.1099/jmm.0.000323

330. Brichacek B, Lagenaur LA, Lee PP, Venzon D, Hamer DH. In vivo evaluation of safety and toxicity of a *Lactobacillus jensenii* producing modified cyanovirin-N in a rhesus macaque vaginal challenge model. *PLoS One* (2013) **8**(11):e78817. doi: 10.1371/journal.pone.0078817

331. Li HS, Piao DC, Jiang T, Bok JD, Cho CS, Lee YS, Kang SK, Choi YJ. Recombinant interleukin 6 with M cell-targeting moiety produced in *Lactococcus lactis* IL1403 as a potent mucosal adjuvant for peroral immunization. *Vaccine* (2015) **33**(16):1959-67. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.02.061

332. Kajikawa A, Masuda K, Katoh M, Igimi S. Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 β . *Clin Vaccine Immunol* (2010) **17**(1):43-8. doi: 10.1128/cvi.00337-09

謝辞

本論文は筆者が信州大学大学院総合工学系生物・食料科学専攻博士課程において、分子生命工学研究室で行った研究を纏めたものです。信州大学学術研究院（農学系）下里剛士 准教授には指導教員として本研究を実施する機会を与えていただき、その遂行において学術面、技術面ともに多大なる御指導、御助言を頂きました。ここに深謝の意を表します。また、副査として本論文を御精査頂き、貴重なコメントの数々を賜りました信州大学学術研究院（農学系）鏡味裕 教授、信州大学学術研究院（農学系）真壁秀文 教授、東北大学大学院農学研究科 北澤春樹 准教授、信州大学学術研究院（農学系）加藤新平 准教授に深く感謝申し上げます。組織切片の作成や病理組織学的解析の際、研究環境や資材をご提供いただき、御指導、御助力を頂いた信州大学学術研究院（農学系）渡邊敬文 助教に深謝いたします。この際、技術的ご協力を頂きました信州大学大学院総合工学系研究科 西村佳 氏に感謝申し上げます。ウエスタンブロッティングや HO-1 の活性試験、scFv 抗体の免疫活性解析において、研究環境や資材をご提供いただき、御指導、御助力を頂いた信州大学学術研究院（農学系）伊原正喜 助教に深謝いたします。この際、技術的ご協力を頂きました信州大学大学院総合工学系研究科 工藤海 氏に感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、医学的視点から数々の有益な御助言、御指導を頂きました横浜市立大学医学部医学科 佐藤隆 講師に深謝申し上げます。統計解析において数々の御助力、御指導を頂いた宮城大学食産業学部ファームビジネス学科 須田義人 教授に深謝申し上げます。折に触れて数々の御助言、御指導を頂きました信州大学学術研究院（農学系）上野豊 助教、信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所 荻田佑 助教に深謝いたします。最後に、同じ研究室で研究活動を共にし、多くの討論で高め合った山本祥也君、Shireen Nigar さん、須藤恒一君、生井楓君をはじめとして、お世話になりました分子生命工学研究室の皆様心より感謝申し上げます。本当にありがとうございました。

本研究の一部は日本学術振興会科研費（No. 14J06317）の助成を受けて行われました。

平成 29 年 1 月 25 日 重盛 駿

公表論文

1. Suguru Shigemori, Kazushi Oshiro, Pengfei Wang, Yoshinari Yamamoto, Yeqin Wang, Takashi Sato, Yutaka Uyeno, Takeshi Shimosato. Generation of dipeptidyl peptidase-IV-inhibiting peptides from β -lactoglobulin secreted by *Lactococcus lactis*. *Biomed Research International*, Volume 2014, Article ID 393598, August 2014.
2. Suguru Shigemori, Takafumi Watanabe, Kai Kudoh, Masaki Ihara, Shireen Nigar, Yoshinari Yamamoto, Yoshihito Suda, Takashi Sato, Haruki Kitazawa, Takeshi Shimosato. Oral delivery of *Lactococcus lactis* that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice. *Microbial Cell Factories*, Volume 14, Article ID 189, November 2015.
3. Suguru Shigemori, Masaki Ihara, Takashi Sato, Yoshinari Yamamoto, Shireen Nigar, Tasuku Ogita, Takeshi Shimosato. Secretion of an immunoreactive single-chain variable fragment antibody against mouse interleukin 6 by *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 101, Page 341-349, January 2017.
4. Suguru Shigemori, Takeshi Shimosato. Applications of genetically modified immunobiotics with high immunoregulatory capacity for treatment of inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, Volume 8, Article ID 22, January 2017.