

信州大学審査学位論文

オリゴ核酸による新規免疫調節作用の
探索と応用に関する研究

平成30年3月

山本 祥也

目次

	頁
第一章 序論	1
第二章 乳酸菌由来オリゴ DNA とソバ抗原を用いた簡易的な アナフィラキシーショックモデルマウスの作出	13
2-1 緒言	14
2-2 材料および方法	16
2-3 結果	24
2-4 考察	30
第三章 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを誘導する オリゴ DNA の発見とマウス敗血症軽減効果の検討	32
3-1 緒言	33
3-2 材料および方法	35
3-3 結果	41
3-4 考察	52
第四章 総論	55
参考文献	60
謝辞	77
公表論文	78

第一章

序論

1-1 微生物と人類との関わり

微生物の発見は 17 世紀にオランダの織物商レーウェンフック (Antony van Leeuwenhoek, 1632-1723 年) による(1)。微生物とは通常肉眼では見えない「小さな生物」の意味で、これら微小生物を取り扱う学問が微生物学 (Microbiology) である。微生物学の対象には、真菌 (fungi)、原生動物 (原虫) (protozoa)、細菌 (bacteria) やウイルス (virus) が含まれる。このうちウイルスを除く 3 者は生物の基本単位である細胞構造を有し、微生物 (Microorganism) と呼ばれる(1)。ヒトを含めた動物および植物はこれら微生物と深く関わりをもって生存している。微生物のあるものはヒトの体内に侵入すると病気を起こし、これを感染症という(1)。世界の人々の死因は、先進国ではがんや循環器病での死亡率が高いのに対し、発展途上国では感染症で死亡する率が高く 50%を占める(2)。中でも呼吸器感染症や感染性下痢症などが多く、エイズ、マラリアおよび結核といった感染症では未だに多くの人が命を落としている(2)。

こうした病気の原因となる微生物は微生物のごく一部であり、大部分の微生物は人に無害であり、逆に有益なものも存在する。例えば、ヨーグルトやチーズ製造に用いられる乳酸菌が挙げられる。乳酸菌と人類の関わりは古く、乳酸菌は 1857 年にフランスの細菌学者ルイ・パスツール (Louis Pasteur, 1822-1895 年) に発見されるよりも前に発酵乳を製造するために広く用いられていた(3)。驚くべきことに、食品添加物としての乳酸菌の使用は、発酵乳が人類に消費された西暦紀元開始以前まで遡り、今日では私たちの生活に欠かすことのできない微生物となっている(4, 5)。また、微生物を用いた組換えタンパク質発現システムは産業や生物工学研究において重要なツールである。大腸菌は人類や動物において深刻な下痢を引き起こす起因菌として知られているが(6)、ペプチドおよびタンパク質を得る場合には、最も使用される宿主である(7, 8)。このため、大腸菌も人類に有益な微生物の一つと言える。さらに近年では共生微生物が研究の対象として注目されている。皮膚、消化管、呼吸器、口腔および膣など、人類の体のあらゆる表面には、細菌が常在している。その数は数百兆個、重さにして 1-2kg と膨大であり、それぞれの場所にそれぞれのバランスを保って定着している(9)。これら細菌は、ただそこに存在しているだけでなく、細菌同士あるいは人類などの宿主と密接なクロストークを行いつつ、安定した複雑な生態系を構成している(10)。

感染症に対応するため、人類は微生物の構造や人体やマウスへの影響、また人類など脊椎動物の免疫の仕組みを研究し、その構造を理解することで感染症に備えてきた。脊椎動物は絶えず微生物の侵入により脅かされており、感染性の病原体を排除するための免疫防御を進化させてきた(11)。哺乳類の免疫システムは自然免疫と獲得免疫の 2 つに大別される。自然免疫システムは病原体に対する最初の宿主防御ラインであり、マクロファージや樹状細胞 (DC) を含む

貪食細胞によって媒介される(11)。獲得免疫システムは感染後期における病原体の排除に関わっている(11)。さらに分子レベルでも詳細に免疫関連因子が研究されている。自然免疫システムはパターン認識受容体 (PRRs) を利用してその役割を果たしている(12, 13)。PRRs はウイルスあるいは細菌のような感染病原体構成要素を保存した病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識することができる広範囲の分子から構成されている(14)。PRRs には Toll-like receptors (TLRs) や nucleotide oligomerization domain (NOD) -like receptors (NLRs) が含まれる(15)。その中でも TLR は感染からの宿主防御において役割が解明されている PRRs のファミリーである(16, 17)。TLR は PAMPs を認識し、自然免疫および獲得免疫を介した免疫シグナルを活性化する(18)。哺乳類では、12 の TLR ファミリーが同定されている。TLR は 1 型の膜内在性タンパク質であり 3 つのモジュール構造をとる。細胞外の N 末端ドメインはおおよそ 16-28 のロイシンリッチリピート (LRR) 配列で構成されており、それぞれの LRR は “LxxLxLxxN (x: アミノ酸)” という保存されたモチーフを有する 20-30 のアミノ酸で構成されている。細胞内の C 末端ドメインは Toll/IL-1 受容体ドメインとして知られており、インターロイキン (IL) -1 受容体とのホモロジーを示す(11, 19-21)。細菌は細胞壁の染色の違いによりグラム陽性菌とグラム陰性菌の 2 つに大別される。また *Mycobacteria* は精巧な作用機序によりマクロファージにおいて生存している細胞内細菌である(11) (Table 1-1)。主な TLR のリガンドとして、グラム陽性菌のペプチドグリカン (Peptidoglycan, PGN)、*Mycobacteria* のリポアラビノマンナン (Lipoarabinomannan, LAM)、細菌、*Mycobacteria* および *Mycoplasma* に由来するジアシル/トリアシルリポペプチド (Lipopeptide)、グラム陰性菌のリポ多糖 (Lipopolysaccharide, LPS)、鞭毛成分のフラジェリン (Flagellin)、および非メチル化 CpG DNA に富むゲノム DNA が同定されている。また、PGN および LAM は TLR2、Lipopeptide は TLR2/1 および TLR2/6、LPS は TLR4、Flagellin は TLR5、非メチル化 CpG DNA は TLR9 にそれぞれ認識される(22) (Table 1-2)。それぞれの TLR による様々な細菌構成成分の認識は、マクロファージや樹状細胞より腫瘍壊死因子 (TNF) - α 、IL-1 β 、インターフェロン (IFN) - γ および IL-12 のような炎症性サイトカイン産生を誘導し、細菌の排除システムとして機能している(22-24)。

1-2 免疫機能性分子オリゴ核酸

TLR の中でも TLR9 の活性化に関与するオリゴ核酸 (oligodeoxynucleotide, ODN) は非常にユニークで活性が強力な短い 1 本鎖核酸素材であり、近年の微生物学の発展とともにその効果が注目されている分子である。ODN には、免疫増強性を有する CpG ODN と免疫抑制性を有する inhibitory ODN (iODN) が存在する。

1-2-1 CpG ODN と iODN

1-1 で前述したように、TLR9 は非メチル化 CpG DNA に富むゲノム DNA を認識し、微生物に対して免疫応答を誘導する(22)。脊椎動物の DNA と比較し、細菌の DNA は少なくとも 20 倍以上の CpG モチーフを有しており、PAMPs として働いている(17)。哺乳類の TLR9 はエンドソーム/ライソソームで CpG ODN と直接結合する(25)。CpG ODN は、(a) NK 細胞、マクロファージおよび DC などの抗原提示細胞 (APCs) の活性化、(b) 未成熟 DC の APCs への成熟の惹起、サイトカインを産生する成熟 DC の活性化、(c) DC のマイグレーションの増加、(d) 主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) class II、CD40、CD80 および CD86 といった共刺激分子発現の増加、(f) Th1 免疫応答を誘導する DC の駆動、それに伴う免疫グロブリン (Ig) E 合成の抑制および IgG および IFN- γ 産生の促進、(g) Th1 応答を促進し、特異的病原体あるいは腫瘍細胞毒性への細胞媒介免疫を向上する IFN- γ 、IFN- α/β 、IL-12 および IL-18 産生の初動といった免疫機能を調節する(26-30)。CpG ODN は大きく Class A、B、C に分類され、配列の違いにより様々な免疫機能性を有している(31)。これらは CpG モチーフ配列におけるわずかな違いにより区別され、異なる性質の細胞に効果を働かせる。特に、Class A CpG ODN は形質細胞様 DC (pDC) からの IFN- α の強力な誘導剤だが、B 細胞への影響は弱い。一方、Class B CpG ODN は B 細胞に増殖および抗体産生のような強力な効果を働かせる。Class C CpG ODN は Class A および B CpG ODN の特徴を兼ね備えており、B 細胞および pDC 両方を強力に活性化させる(32)。それゆえに、CpG ODN は感染症、腫瘍、アレルギーおよび炎症性疾患の予防あるいは治療を目的としたアジュバントとして期待されている(33)。

iODN は以前、Trieu らにより、配列や効果に基づいて Class I、II、III および IV の 4 つに分類されている(34)。Class I iODN はグアニン (G) を伸長した ODN で、TLR9 特異的競合剤である(35, 36)。Class I の G リッチモチーフは治療のアプリケーションに向け、選択的で強力な TLR9 阻害剤として最も有望視されている(35)。Class II iODN はテロメア配列の繰り返しであり、TLR9 非依存的なシグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT) 1、3 および 4 シグナリングの阻害剤であり、免疫応答の強力な抑制剤である(37)。Class III iODN は 4 本鎖構造を形成するオリゴ dG を含み、DNA の取り込みを阻害する。Class IV iODN は非配列特異的に TLR9 応答を阻害する長鎖 PS-ODN である(38)。すなわち、iODN は CpG ODN の阻害剤として用いられる(35, 39)。しかしながら近年では、CpG ODN の阻害剤としてだけでなく、単独の使用によりエンドトキシンショック、珪肺症、炎症性関節炎、乳頭腫、自己免疫疾患およびアトピー性皮膚炎などの疾病に対する効果があることが報告されており(24, 40-45)、新たな予防・治療のツールとしても注目されている。

1-2-2 最近の ODN 研究の動向

2004 年以降、Kitazawa らの研究グループは、乳酸菌やビフィズス菌のゲノム配列から優れた免疫賦活作用を有する ODN を次々と発見し、ODN の農学系における価値を見出した(3) (Table 1-3)。同研究グループは、TLR9 が DC および B 細胞のような免疫細胞だけでなく、腸管に存在する局所免疫器官であるパイエル板における濾胞関連上皮細胞にも発現していることを見出し、腸管上皮細胞が腸内に存在する細菌由来の ODN に対して応答する宿主防御を働かせることを示唆している(46)。また同研究グループは ODN の構造に着目した研究も行なっている。*Lactobacillus gasseri* に由来する AT5ACL および LGAT243 は CpG モチーフを有しておらず、アデノシン (A) およびチミジン (T) に富んでいる。これら ODN について、免疫賦活活性と構造の関連性について詳細に解析を行っており、LGAT243 において AT モチーフと 6 ベースのループ構造が活性に重要であることを突き止めている。同時に *Lactobacillus gasseri* OLL2716 のゲノム情報には AT モチーフが多く含まれることも発見している(47)。このような ODN の構造に着目した研究で、2015 年、ODN 研究を発展させる画期的な報告がされた。Pohar らは、ヒトおよびマウスの TLR9 を活性化するために必要な Class B CpG ODN の最小の配列モチーフを、合成した膨大な ODN 配列を比較することにより同定した(48, 49)。ヒト TLR9 を活性化する最小の Class B CpG ODN は間に 6-10 塩基で分けられる 2 つの CpG モチーフを持ち、また 5' 末端側の T の次に最初の CpG モチーフを配置することで構成される(48)。一方、マウス TLR9 を活性化する最小の Class B CpG ODN は 5' 末端から 4-6 塩基の位置に 1 つの CpG モチーフを配置することで構成される(49)。さらに同研究グループは、エンドソーム内で CpG ODN が分解されることを想定し、CpG ODN の分解物が TLR9 にどのような影響を及ぼすのかを調べた(50)。結果として、CpG ODN の分解物は単独では TLR9 活性化への影響はないが、CpG ODN と組み合わせることで、相乗的に TLR9 活性を増強することを見出した(50)。Chan らの研究グループは、Class A CpG ODN の活性には、エンドソームで DNA を分解する DNase II による分解が必須であることを示している(51)。このように、構造の観点から ODN の活性中心や作用機序を解き明かした研究が多く報告されている。

iODN についても、構造に着目した研究が行われている。2013 年、Ito らは、Class I iODN である H154 と Class II iODN である A151 の推定コア配列から新たな iODN (iSG3) をデザインし、CentroidFold ソフトウェア

(<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) を用いた iSG3 の 2 次構造の予測により 5'-TTAGGG-3' で構成されるループ構造と 3' 末端の 3-5 塩基のオリゴ dG 鎖が活性に必須であることを明らかにしている(38)。Ito らは同時に、iSG3 にはこれまでの iODN になかった抗アレルギー効果を有することを突き止めており(38)、構

造に着目することで ODN の新たな機能性を探索できる可能性を見出している。

CpG ODN は Th1 細胞を誘導および活性化する様々な炎症応答を惹起する(52)。Th1 細胞はアレルギー応答の発症の原因となる Th2 細胞を制御する(53)。このために、CpG ODN では気管支喘息、気道過敏症およびアナフィラキシーなどの多くのアレルギー疾患を改善することが報告されてきた(32, 54, 55)。2009 年に Shimosato らが、乳業用乳酸菌として知られる *Streptococcus thermophilus* ATCC19258 株 *LacZ* 遺伝子配列から強力な免疫増強効果を有する CpG ODN (MsST) を同定した(56)。また Wang らは、ODN を経口により生体内へと投与するためのキャリアーの開発を遂行した。ODN は胃酸などの強酸や DNA 分解酵素に弱点を有しており、Wang らは ODN をカルシウム性ナノ粒子により包摂することで、これらの弱点を克服する DNA ナノカプセル

(DNanocap) の開発に成功した(45)。さらに MsST および iSG3 を包摂した DNaanocap を作成し、アトピー性皮膚炎 (AD) モデルマウスへの長期経口投与試験を実施した。結果として、MsST の DNaanocap では AD の悪化、あるいは iSG3 の DNaanocap では AD の改善効果が認められ、経口素材としての価値を見出した(45)。2010 年に Shimosato らは、MsST が強力に IL-33 を誘導することを報告している(57)。この IL-33 やその受容体は喘息および食物アレルギーのようなアレルギー疾患の悪化に関わっている(58, 59)。また MsST は炎症誘導に関連する IFN- γ を誘導する。IFN- γ は本来 Th2 細胞活性化を抑制する Th1 細胞を活性化し、アレルギーを改善することが期待されるサイトカインであるが、AD において CpG ODN により誘導される過剰な IFN- γ 産生は AD を悪化させることが報告されている(60)。これらのために、MsST により悪化した AD は IL-33 および過剰な IFN- γ が関与すると考察されている(45)。しかしながら、MsST の投与によりアレルギーが悪化するという知見は、CpG ODN の強力な抗アレルギー効果とは真逆の効果であり、この作用機序の詳細な解明には現在でも至っていない。

MsST が IL-33 を誘導するように、新たな生理活性物質の誘導を特徴付けられた ODN が次々と報告されている。例えば、Tripathi らは Class A CpG ODN は IL-22 を誘導し、移植した膵島の生存率を向上することで、遺伝的にインスリン分泌が破綻していることで惹起する 1 型糖尿病の治療に貢献することを報告している(61)。また Hong らは TLR9 欠損マウスを用いて 2 型糖尿病における TLR9 の役割を解析し、TLR9 欠損により血中グルコースやインスリン濃度が増加することや食欲抑制ホルモンであるレプチンやインスリン受容体を介さない糖取り込みの促進をするアディポネクチンが減少することを示している。これらの結果、TLR9 は 2 型糖尿病を制御することを明らかにしている(62)。このように、近年では TLR9 と様々な生理活性物質やそれに関わる疾患との関連性が

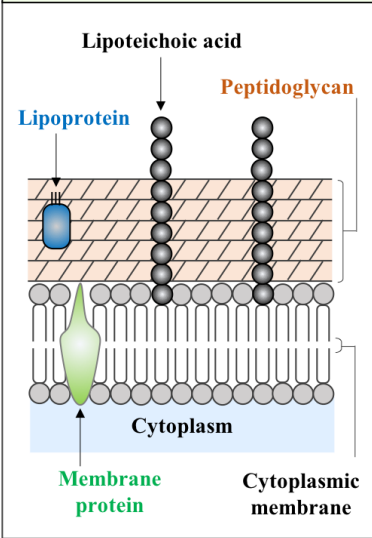
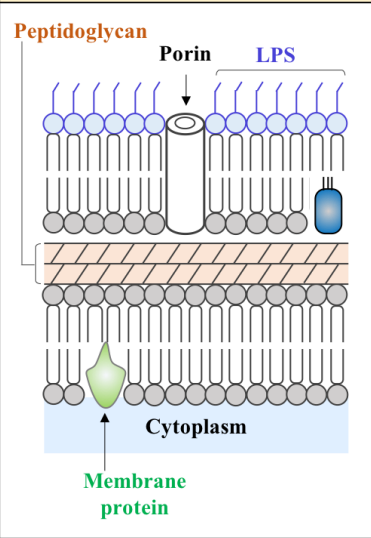
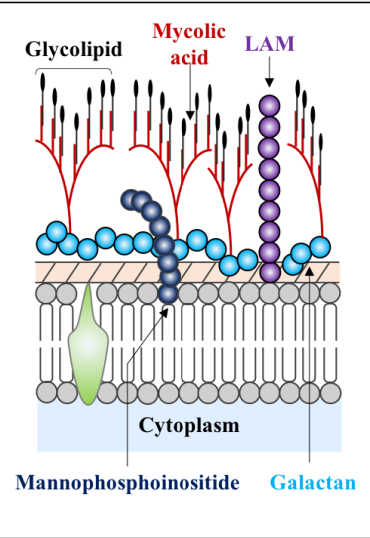
明らかになり、ODN の新たなアプリケーションとしての価値が期待されている。

1-3 研究の目的

TLR のような未知で複雑な免疫システムの解明は、医学の発展だけでなく、今日、食品の機能性に関する研究が急速に発展している農学分野においても必須である。将来的に ODN を人類や家畜の様々な疾患の予防および治療に用いるためには、MsST のように「アレルギーを悪化させる」という ODN の作用機序を詳細に調べておくことは避けられない。また、本現象を逆手にとり、アレルギーモデルの作出に ODN を用いることで、ODN の新たな利用価値を創造できる。さらに、ODN の新規機能性の探索は、人類や家畜の健康および生活を向上するだけでなく、微生物に対して進化してきた免疫システムの全貌を解き明かすことに貢献できる。これらのために、本研究では、ODN とアレルギーおよび敗血症との関連性について研究を行った。具体的には以下の研究を遂行した。

1. IFN- γ および IL-33 を強力に誘導する ODN を用いて、より簡易的にアナフィラキシーを惹起するモデルマウスの作出を試みた。
2. PAF-AH を誘導する ODN を探索し、敗血症モデルマウスにおける敗血症性ショックの軽減効果を検討した。

Table 1-1 Component of bacterial cell wall

Gram-positive bacteria	Gram-negative bacteria	Mycobacteria
		

Gram-positive bacteria have a thick layer of PG. Lipoteichoic acids and lipoproteins are embedded in this cell wall. The cell wall of Gram-negative bacteria is characterized by the presence of LPS. Mycobacteria have a thick hydrophobic layer containing mycolyl arabinogalactan and dimycolate, in addition to a lipid bilayer and a PG layer. Lipoarabinomannan (LAM) is a major cell-wall-associated glycolipid. Lipoproteins are common structures for various types of bacteria. The table is referred from Akira et al. (11).

Table 1-2 A relationship between TLR and PAMPs(22)

TLR	Location of TLR	PAMPs recognized by TLR	Co-receptor (s)	Signaling adaptor	Transcription factor (s)	Effector cytokine induced
TLR1/2	Plasma membrane (cell surface)	Triacyl lipopeptides (Bacteria and Mycobacteria)	Heterodimer of TLR1/2 forms a functional receptor	TIRAP, MyD88	NF-κB	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.)
TLR2	Plasma membrane (cell surface)	Peptidoglycan (Gram-positive bacteria) LAM (Mycobacteria) hemagglutinin (Measles virus) phospholipomannan (Candida) Glycosylphosphatidyl inositol mucin (Trypanosoma)	CD36, RP105	TIRAP, MyD88	NF-κB	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.)
TLR3	Endosome	ssRNA virus (WNV) dsRNA virus (Reovirus) RSV MCMV		TRIF	NF-κB, IRF3, 7	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.), type I IFNs
TLR4	Plasma membrane (cell surface)	LPS (Gram-negative bacteria) Mannan (Candida) Glycoinositol	MD2, CD14, LBP, RP105	TIRAP, MyD88, TRAM and TRIF	NF-κB, IRF3, 7	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.), type I IFNs

		phospholipids (Trypanosoma) Envelop proteins (RSV and MMTV)				
TLR5	Plasma membrane (cell surface)	Flagellin (Flagellated bacteria)		MyD88	NF-κB	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.)
TLR6/2	Plasma membrane (cell surface)	Diacyl lipopeptides (Mycoplasma) LTA (Streptococcus) Zymosan (Saccharomyces)	Heterodimer of TLR6/2 or dectin-1 forms a functional receptor	TIRAP, MyD88	NF-κB	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.)
TLR7	Endosome	ssRNA virus (VSV, Influenza virus)		MyD88	NF-κB, IRF7	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.), type I IFNs
TLR8	Endosome	ssRNA from RNA virus		MyD88	NF-κB, IRF7	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.), type I IFNs
TLR9	Endosome	dsDNA viruses (HSV, MCMV) CpG motifs from bacteria and viruses Hemozoin (Plasmodium)		MyD88	NF-κB, IRF7	Inflammatory cytokines (TNF-α, IL-6 etc.), type I IFNs
TLR11	Plasma membrane	Uropathogenic bacteria		MyD88	NF-κB	Inflammatory cytokines

(cell
surface)

(TNF- α , IL-6
etc.)

profilin-like
molecule

(*Toxoplasma gondii*)

LAM, Lipoarabinomannan; WNV, West Nile virus; RSV, Respiratory syncytial virus; MCMV, Murine cytomegalovirus; MMTV, Mouse mammary tumor virus; LTA, Lipoteichoic acid; VSV, Vesicular stomatitis virus; HSV, Herpes simplex virus and CpG, Cytidine-phosphate-guanosine.

Table 1-3 Immune-stimulatory ODN from lactic acid bacteria and Bifidobacterium (3)

Name	Origin	Sequence 5' - 3'	Reference
OLLB7	<i>Lactobacillus Bulgaricus</i>	CGGCACGCTCACGATTCT	(63)
	NIAIB6	TG	
ID35	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ACTTTCGTTTTCTGCGTC	(64, 65)
	GG (ATCC53103)	AA	
BL7	<i>Bifidobacterium longum</i>	GCGTCGGTTTTCGGTGCTC	(66-68)
	BB536	AC	
AT5ACL	<i>Lactobacillus gasseri</i>	TATAATTTTTACCAACTA	(69, 70)
	JCM1131 ^T	GC	
LGAT243	<i>Lactobacillus gasseri</i>	TTAACAATTTTTACCCAA	(47)
	OLL2716	GA	
MsST	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CAGGACGTTGTATCACT	(56, 57)
	(ATCC19258)	GAA	

第二章

乳酸菌由来オリゴ核酸とソバ抗原を
用いた簡易的なアナフィラキシー
ショックモデルマウスの作出

2-1 緒言

アレルギーとは多くの人では正常に寛容化される特異的環境抗原への過剰な免疫応答であり、過敏症と同義である。アレルギーの中でも、食物アレルギーは成人の2-10%に影響を及ぼし、運動により誘発されるアナフィラキシーやコリン性蕁麻疹のような多彩で重篤な健康問題を惹起する(71, 72)。食物性のアナフィラキシーはピーナッツ、ソバ、牛乳、卵および小麦のアレルゲンなど多岐にわたる抗原により誘発される。アナフィラキシーはヒトや他の哺乳類で引き起こされる急性で全身性のアレルギー応答（重篤な I 型過敏症）である(73)。食物アレルギーは生活の質（QOL）に不利に影響し、最悪の場合死をもたらすため、これらアレルギー応答を研究するための適切なアナフィラキシーショックモデルの開発が求められている。Th2細胞は、IL-4、IL-5およびIL-13などのプロ炎症性サイトカインを産生し、B細胞の形質細胞への分化を誘導することから、アレルギー反応の発症において重要な役割を果たしていると考えられている(72)。このように、これらサイトカイン、特にIL-4での刺激に対する応答において、B細胞はクラススイッチを受け、高親和性免疫グロブリンE（IgE）抗体を産生する形質細胞へと分化する(72)。

IL-33および過剰なIFN- γ はアトピー性皮膚炎（AD）モデルマウスにおいてアレルギー感作を誘導するが、時間をかけてアレルギー応答の強度を悪化することが示されている(45, 60, 74)。IL-33は肥満細胞やTh2細胞に発現するST2受容体と結合する(75, 76)。そのためST2はIL-33の生理学的な活性を媒介し、結果としてTh2に偏したアレルギー性の炎症を生じると考えられている。IL-33はTh2細胞の分裂を介してin vivoおよびin vitroの両方でIL-4、IL-5およびIL-13などのTh2関連サイトカイン産生を増強する(77)。またTakakuraらは、ADはリコンビナントIFN- γ の腹腔内投与（i.p.）により悪化することを報告している(60)。さらにWangらおよびShimosatoらは、乳業用乳酸菌*Streptococcus thermophilus* ATCC19258のlac Z遺伝子より同定した強力な免疫増強型CpG ODN（MsST）がIL-33およびIFN- γ 産生の両方を誘導することをin vivoおよびin vitroの両方で示した(45, 57)。このMsSTのマウスへの投与はIL-33およびIFN- γ 産生の誘導を介してアレルギーを悪化することが示唆されている(78)。

そこで本研究では、アナフィラキシーのモデルマウスを作出する目的でアジュバント分子としてMsSTを使用した。アナフィラキシーモデルマウスは卵白のアレルゲン、オバアルブミン（OVA）あるいはピーナッツを用いて多くの研究グループによって作出されている(32, 79-81)。アナフィラキシーモデルを確立するためには、アジュバントと混ぜたアレルゲンを皮下投与（s.c.）あるいはi.p.で繰り返し投与し、大量のアレルゲンを尾静脈投与（i.v.）により投与することが必要である。しかしながら、i.v.および経口投与（i.g.）による手法は高度な手技を要する上、1匹あたりの処理時間が長く、さらにモデル動物を確立するための期間を要するために動物実験を行う上で問題となっている。そこで

本研究では、IL-33およびIFN- γ を誘導する強力な免疫刺激性分子MsSTをi.p.ルートでマウスに投与することで、簡易的なアナフィラキシーモデルマウスを作出することを目的に研究を行った。

2-2 材料および方法

2-2-1 倫理的承認

全ての動物実験は、「信州大学動物実験等実施規程」に従い、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：260060）。

2-2-2 試薬

実験にはとくに断りの無い限り、（株）和光純薬工業（Osaka, Japan）製の特級あるいは一級試薬を用いた。また、水は全てミリ Q 水を用いた。エンドトキシンフリーの PS 結合 ODN は Integrated DNA Technologies（Coralville, IA, USA）へ合成を委託した。本研究で使用した CpG ODN 1585（ODN₁₅₈₅）、CpG ODN 1826（ODN₁₈₂₆）、CpG ODN 2395（ODN₂₃₉₅）および MsST の配列は Table 2-1 に示した。

2-2-3 アナフィラキシーショックの誘導

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。

アナフィラキシーショックモデルマウスの作出は以下のように行った。5 週齢のマウスに 100 µg の食物抗原（Table 2-2）、2 mg Aluminum Hydroxide gel（Alum, Sigma, MO, USA）および 100-500 µg CpG ODN を含む 200 µL phosphate-buffered saline（PBS）を i.p.により感作した。2 週間後、マウスは 1mg の食物抗原（Table 2-2）および 1.3 mg Alum を含む 200 µL PBS を i.p.することにより刺激し、アナフィラキシーを誘導した。アナフィラキシー症状の重篤度は i.p.から 45 min 後の様子を観察・動画撮影し、映像を根拠資料として Table 2-4 の基準に従いスコア（ANXS）をつけた。尚、実験スケジュールを Fig. 2-1 に示した。

2-2-4 脾臓重量の測定

2-2-3 における抗原刺激 45 min 後にマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、脾臓を摘出した。デジタルカメラ（CX6, Ricoh, Tokyo, Japan）を用いて、脾臓の状態を撮影した。次に、SEFI IBA-200 Calibration（MICRO PRECISION CALIBRATION INC., CA, USA）を用いて、脾臓の重量を測定した。

2-2-5 フローサイトメトリー（FACS）

2-2-5-1 脾臓細胞の調製

2-2-4 における脾臓重量の測定後、シャーレ上で脾臓をすりつぶし、完全 RPMI 1640 培地に回収した。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, 352340, 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) と混合し、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 を用いて 2×10^6 cells/mL に調製し、1 mL/well (2×10^6 cells) で 24well プレート (142475, Nalge Nunc International K. K., Tokyo, Japan) に播種した。

2-2-5-2 細胞内染色

2-2-5-1 における脾臓細胞の調製後、完全 RPMI 1640 培地に、2 μ g/mL イオノマイシンカルシウム (Ionomycin Calcium Salt from *Streptomyces globatus*, 19446-71, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)、10 μ g/mL ブレフェルジン A (BFA: Brefeldin A from *Penicillium brefeldianum*, B7651, Sigma)、20 ng/mL ホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA: Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, 27547-14, Nacalai Tesque Inc.) となるように添加し、活性化培地とした。24well プレートに 2-5-1) の細胞溶液を 2×10^6 cells/500 μ L で播き、活性化培地を 500 μ L 加え、final 1 mL とし、37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ 条件下で 5 hr 培養した。培養後、400 \times g、5 min 遠心を行い、細胞を回収した。細胞固定液 (4% PFA) 200 μ L を加え、よく懸濁した後、25 $^{\circ}$ C、15 min で静置し、細胞を固定した。抗体希釈液 500 μ L を加え、800 \times g、5 min 遠心を行い、細胞を回収した。次に、細胞膜透過液 (0.5 %Triton-X100, 1 %BSA/PBS) 200 μ L を加え、ピペッティングにより穏やかに懸濁した後、4 $^{\circ}$ C、15 min で処理し、膜透過を行った。抗体希釈液 500 μ L を加え、800 \times g、5 min 遠心を行い、細胞を回収した。抗体希釈液で 100 倍希釈した PE-labeled anti-mouse IFN- γ (505807, Biolegend, CA, USA) あるいは anti-mouse IL-33 (516503 Medical & Biological Laboratories, Tokyo, Japan) 抗体 20 μ L で on ice、60 min 染色した。IL-33 の染色では、さらに PE-labeled Streptavidin (405203, Biolegend) 抗体 20 μ L で on ice、60 min 染色した。抗体希釈液 500 μ L を加え、800 \times g、5 min 遠心洗浄を行い、細胞を回収した。細胞を抗体希釈液 300 μ L に懸濁した後、FACS 用チューブ (BD) に回収し、FACS Calibur (BD) にて解析した。

2-2-6 ELISA

2-2-6-1 採血および血清の調製

18G 注射針 (1-4909-01, TERUMO Corporation, Tokyo, Japan) と 10 mL テルモシリンジ (SS-10SZ, TERUMO Corporation) を用い、アナフィラキシー誘導マ

ウスから心臓穿刺により採血を行った。100~150 μ L の血液を回収後、ブロックインキュベーター (BI-516, 株式会社アステック, Fukuoka, Japan) で 24 $^{\circ}$ C、30 min 放置し、その後 4 $^{\circ}$ C 冷蔵庫で一晩静置した。翌日、マイクロ冷却遠心機 (3500, KUBOTA, Tokyo, Japan) で遠心分離し (4 $^{\circ}$ C、3,000 \times g、10 min)、血清を回収し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

2-2-6-2 血清の免疫グロブリン量および肥満細胞プロテアーゼ 1 (MCP-1) の測定

血清サンプルを 100 および 100,000 倍に希釈し、Mouse IgE ELISA Quantitation Kit (E90-115A, Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)、Mouse IgG_{2a} ELISA Quantitation Kit (E90-107A, Bethyl Laboratories) および Mouse IgG₁ ELISA Quantitation Kit (E90-105A, Bethyl Laboratories) を用いて、免疫グロブリン IgE、IgG_{2a} および IgG₁ の発現解析を行った。Capture 抗体 (Affinity purified Mouse IgE coating antibody, A90-115A; Affinity purified Mouse IgG_{2a} coating antibody, A90-107A; Affinity purified Mouse IgG₁ coating antibody, A90-105A) を PBS で 1,000 倍希釈し、96well プレートに 50 μ L/well で播き、4 $^{\circ}$ C 冷蔵庫に一晩置いた。翌日、ブロッカー 1 (PBS-T + 5 %BSA (01859-47, Nacalai Tesque Inc.)) を 100 μ L/well で播き、30 $^{\circ}$ C で 2 hr 静置した。希釈した血清サンプルを添加し、スタンダード曲線は濃度既知の抗原タンパク質 (Mouse IgE Calibrator, RC90-115; Mouse IgG_{2a} Calibrator, RS10-101; Mouse IgG₁ Calibrator, RS10-101) を 1/5 段階希釈により作成し、30 $^{\circ}$ C で 2 hr 静置した。PBS-T およびミリ Q 水で各 well を洗浄した後、HRP 標識抗体 (Goat anti-Mouse IgE-HRP conjugate, A90-115P; Goat anti-Mouse IgG_{2a}-HRP conjugate, A90-107P; Goat anti-Mouse IgG₁-HRP conjugate, A90-105P) をブロッカー 2 (ブロッカー 1 + 5 %FCS (Heat inactivated fetal calf serum, Sigma)) で 10,000 倍希釈し、50 μ L/well で播き、30 $^{\circ}$ C で 1 hr 静置した。もう一度 PBS-T およびミリ Q 水で洗浄し、基質 TMB (05298-80, Nacalai Tesque) を 100 μ L/well で播き、遮光して 24 $^{\circ}$ C で発色させ、1 mol/L 硫酸 (95626-06, Nacalai Tesque) を 100 μ L/well で播き、発色反応を止め、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, CA, USA) で 450 nm の吸光度を測定した。

血清サンプルを 25 倍に希釈し、Mouse MCPT-1 (mMCP-1) ELISA Ready-SET-Go! (50-174-16, eBioscience Inc., CA, USA) を用いて、MCP-1 の発現解析を行った。Capture 抗体 (Anti-Mouse MCPT-1 Purified, E11951-1636) を Coating Buffer (E10287-1639) で 250 倍希釈し、96well プレートに 100 μ L/well で播き、4 $^{\circ}$ C 冷蔵庫に一晩置いた。翌日、PBS-T で洗浄し、Assay Diluent (ELISA/ELISPOT Diluent, E00009-1637) を 200 μ L/well で播き、25 $^{\circ}$ C で 1 hr 静置した。PBS-T で洗浄し、希釈した血清サンプルを添加し、スタンダード曲線は濃度既知の抗原タンパク質 (Mouse MCPT-1 Recombinant Protein, E11955-1635) を 1/2 段階希釈により作成し、24 $^{\circ}$ C で 2 hr 静置した。PBS-T で洗浄した

後、Detection 抗体（Anti-Mouse MCPT-1 Biotin, E11953-1636）を Assay Diluent で 250 倍希釈し、100 μ L/well で播き、24 $^{\circ}$ C で 1 hr 静置した。PBS-T で洗浄し、Avidin-HRP（E00005-1636）を Assay Diluent で 250 倍希釈し、100 μ L/well で播き、24 $^{\circ}$ C で 30 min 静置した。再度 PBS-T で洗浄し、基質 TMB（TMB Solution, E00007-1639）を 100 μ L/well で播き、遮光して 24 $^{\circ}$ C で発色させ、1 mol/L 硫酸を 50 μ L/well で播き、発色反応を止め、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。

2-2-7 統計処理

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。全てのデータは一元配置分散分析で解析後、ANXS を除いて Student-Newman-Keuls（SNK）検定を用いて解析した。ANXS の群間比較はスチューデント T 検定を用いて解析した。有意水準 α は 0.05 を用いた。

Table 2-1 CpG ODN sequences used in this study

Name	ODN class	Sequence 5' - 3'	Reference
ODN1585	Class A CpG ODN	G*GGGTCAACGTTGAG*G*G*G* G*G	(82)
ODN1826	Class B CpG ODN	T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C *T*G*A*C*G*T*T	(83)
ODN2395	Class C CpG ODN	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G* C*G*C*G*C*G*C*C	(84)
MsST	Class B CpG ODN	C*A*G*G*A*C*G*T*T*G*T*A*T *C*A*C*T*G*A*A	(57)

Asterisks (*): phosphorothioate bond

Table 2-2 Food antigen used in this study

Food antigen	Reference
Buckwheat (BW, Fagopyrum esculentum, lyophilized form, GREER Laboratories, Lenoir, NC, USA)	(85)
α -casein from bovine milk, $\geq 70\%$ α s-casein (CAS, Sigma)	(86)
β -lactoglobulin (BLG, Sigma)	(87)
albumin from chicken egg white (Ovalbumin, OVA, grade V; Sigma)	-

Table 2-3 Score of anaphylactic symptom

Score	Status
0	No symptom
1	Moving, scratching, rubbing of face and snout.
2	Crouching, open eyes, moving in response to tapping the cage with a glass rod.
3	Weak cyanosis, no moving in response to tapping the cage with a glass rod. Movement in response to tapping the body with a glass rod.
4	Severe cyanosis. No movement in response to tapping the body with a glass rod.

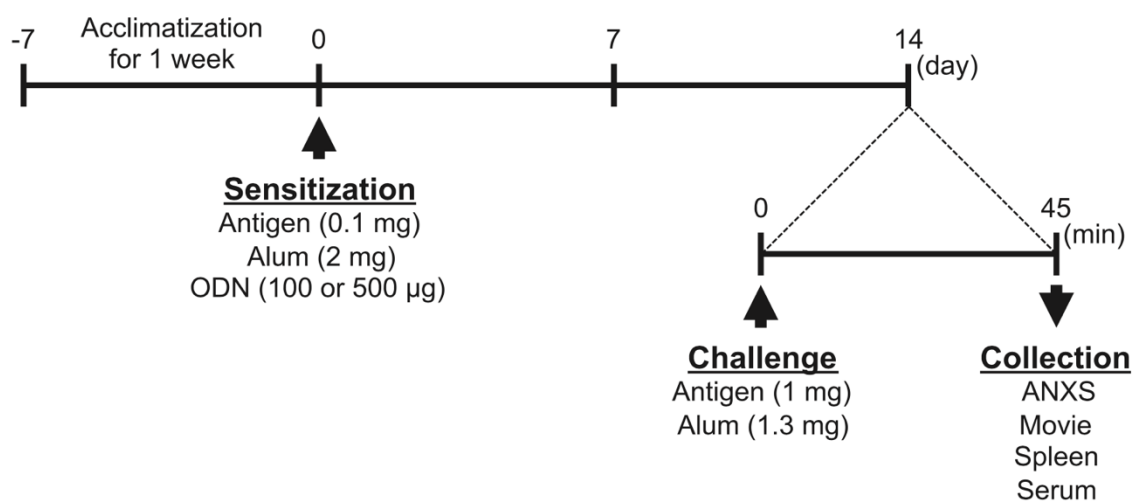


Fig. 2-1 Schedule for inducing anaphylactic shock in female BALB/c mice. Five-week-old mice were initially sensitized with 100 µg antigen and 2.0 mg alum gel as adjuvant administered intraperitoneally (i.p.). After 2 weeks, mice were i.p. challenged with 1 mg antigen and 1.3 mg alum gel. The severity of anaphylactic symptoms was assessed 45 min after the final antigen challenge. The figure is taken from Yamamoto et al. (84).

2-3 結果

2-3-1 MsST と抗原の併用によるアナフィラキシーの誘導効果

BALB/c、5 週齢、雌マウスに 100 μ g の BW と 2.0 mg の Alum、加えて 100 μ g の MsST を含む PBS 200 μ L を i.p.により感作させた。2 週間後に 1.0 mg の BW と 1.3 mg の Alum を i.p.により刺激し、アナフィラキシーの症状を観察した (Fig. 2-1)。最終刺激 45 min 後におけるアナフィラキシーショック症状を 0-4 点の ANXS でスコア化した (Fig. 2-2)。BW 群と比較して、BW+MsST 群の ANXS はより高くなった (BW 群: $n=10$, average=2.20 \pm 0.29; BW+MsST 群: $n=10$, average=3.00 \pm 0.26, $p=0.054$, Fig. 2-2)。また、CAS あるいは BLG+MsST 群と比較して、BW+MsST 群は高い ANXS が得られたが、OVA+MsST 群および BW+MsST (500 μ g) 群との比較では同様のスコアが得られた (CAS+MsST 群: $n=5$, average=1.20 \pm 0.73; BLG+MsST 群: $n=5$, average=1.60 \pm 0.40; OVA+MsST 群: $n=5$, average=3.00 \pm 0.00; BW+MsST (500 μ g) 群: $n=5$, average=3.00 \pm 0.32, Fig. 2-2)。BW と ODN1585 (Class A)、ODN1826 (Class B) および ODN2395 (Class C) で感作したマウスでは、BW+ODN1585 群および BW+ODN1826 群でのみ強力なアナフィラキシーが観察された (Fig. 2-2)。これらの結果は BW と 100 μ g の MsST の組み合わせが i.p.を介した強力なアナフィラキシーショックの誘導に有効であることを示唆した。

2-3-2 BW+MsST を i.p.したマウスにおける脾臓重量に及ぼす影響

アナフィラキシー誘導 45 min 後のマウスを安楽死させ、その後の解剖において脾臓を摘出し、無処理マウス (NT)、BW または MsST を加えた BW で感作したマウスにおける脾臓重量を比較した。NT および BW 群と比較し、BW+MsST 群においてマウス脾臓組織の肥大 (脾腫) を確認した (Fig. 2-3A-C)。また、NT および BW 群と比較し、BW+MsST 群において有意な脾臓重量の増加が認められた (Fig. 2-3D)。

2-3-3 BW+MsST を i.p.したマウスにおけるマウス血清 IgG_{2a} の誘導

NT 群、BW 群および BW+MsST 群における血清 IgE、IgG₁、IgG_{2a} および MCP-1 産生量を ELISA 法により測定した (Fig. 2-4)。血清 IgE 産生量は BW 群と BW+MsST 群で有意に異なった (Fig. 2-4A)。これは MsST の投与が IgE 産生を抑制したことを示している。血清 MCP-1 産生量と IgG₁ 産生量は BW 群と BW+MsST 群の間で大きな変化は認められなかった (Fig. 2-4B, D)。一方で、血清 IgG_{2a} 産生量は BW+MsST 群において有意に増加した (Fig. 2-4C)。これらの結果は MsST によるアナフィラキシー症状の悪化は IgE ではなく、IgG_{2a} に依存することを示唆している。

2-3-4 IFN- γ ⁺および IL-33⁺細胞が BW+MsST 群において増強する。

NT 群、BW 群および BW+MsST 群の脾臓における IFN- γ ⁺および IL-33⁺細胞の割合を解析した (Fig. 2-5)。IFN- γ ⁺および IL-33⁺細胞数は NT 群と比較し、BW+MsST 群で有意に増加した (Fig. 2-5B, C)。特に、BW+MsST 群は BW 群と比較して IFN- γ ⁺細胞を有意に増加した (Fig. 2-5B)。これらの結果は MsST によるアナフィラキシー症状の誘導は IL-33 ではなく IFN- γ に依存することを示唆している。

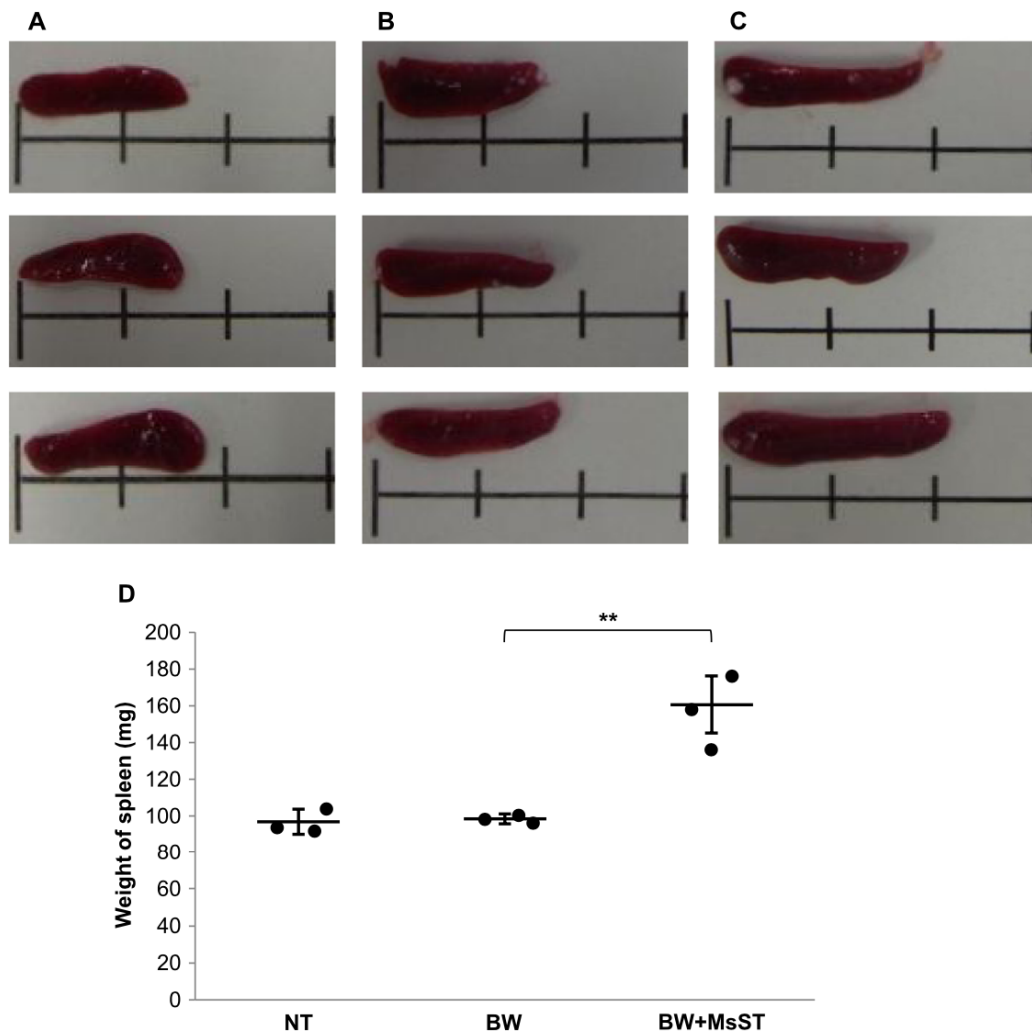


Fig. 2-3 Effect of MsST on mouse spleen size and weight. Five-week-old mice were initially sensitized with 100 μ g of buckwheat (BW) and 2.0 mg alum gel with or without 100 μ g MsST as adjuvant administered intraperitoneally (i.p.). After 2 weeks, mice were i.p. challenged with 1.0 mg of BW and 1.3 mg of alum gel. Forty-five minutes following the final antigen challenge, mice spleens were collected, photographed as non-treated (NT) (A), BW (B), BW+MsST group (C), and weighed (D). Scale bar equals 1 cm. The results represent the mean \pm SE (n = 3) from three independent experiments with similar results. **Indicates a statistically significant difference ($P < 0.01$). The figure is taken from Yamamoto et al. (84).

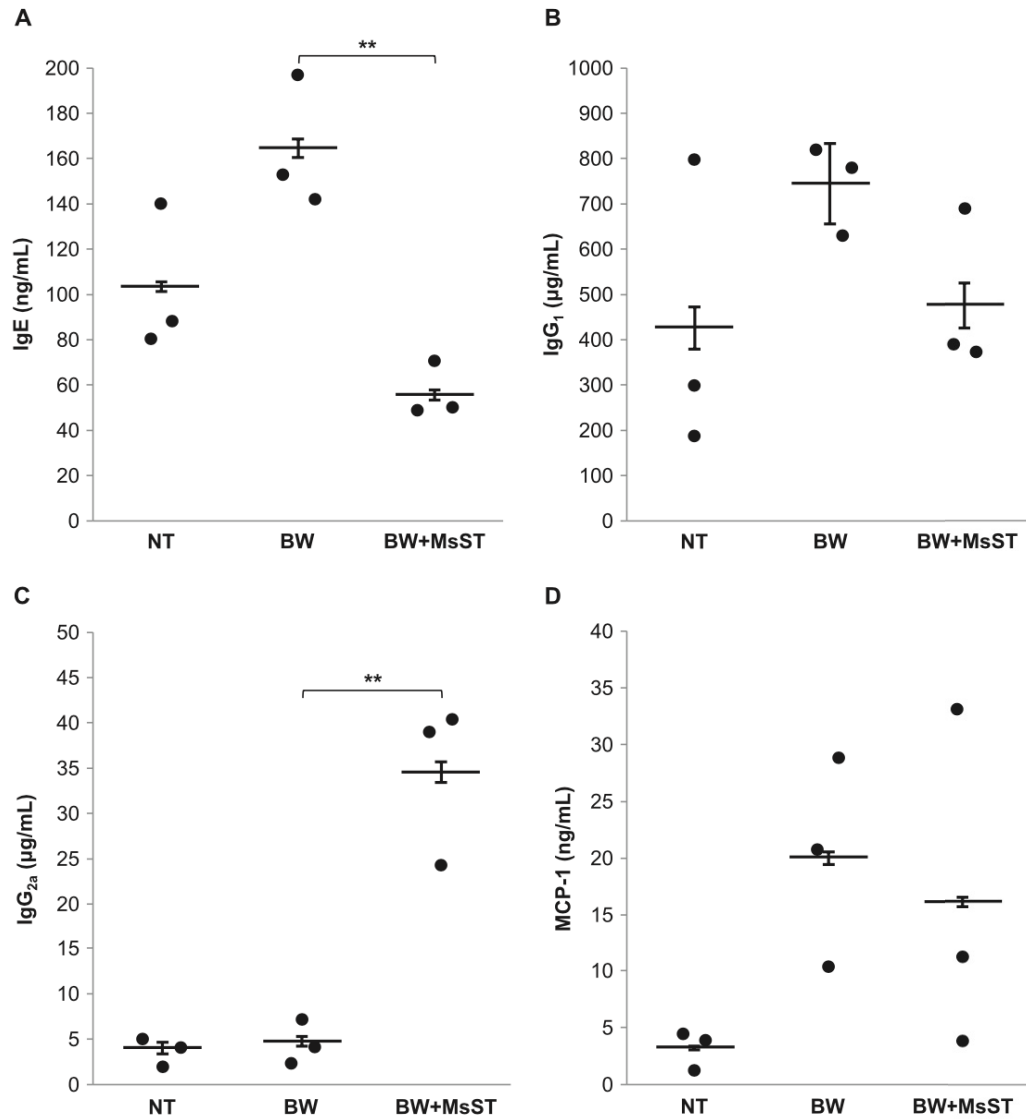


Fig. 2-4 Effect of MsST on serum immunoglobulin E (IgE), IgG₁, IgG_{2a} and mast cell protease-1 (MCP-1) production. Forty-five minutes following the antigen challenge, serum was collected, and the levels of IgE (A), IgG₁ (B), IgG_{2a} (C) and MCP-1 (D) were then measured by ELISA. Data are shown as the mean \pm SE for each animal; n = 3 mice/group. **P < 0.01 for the indicated group(s). The figure is taken from Yamamoto et al. (84).

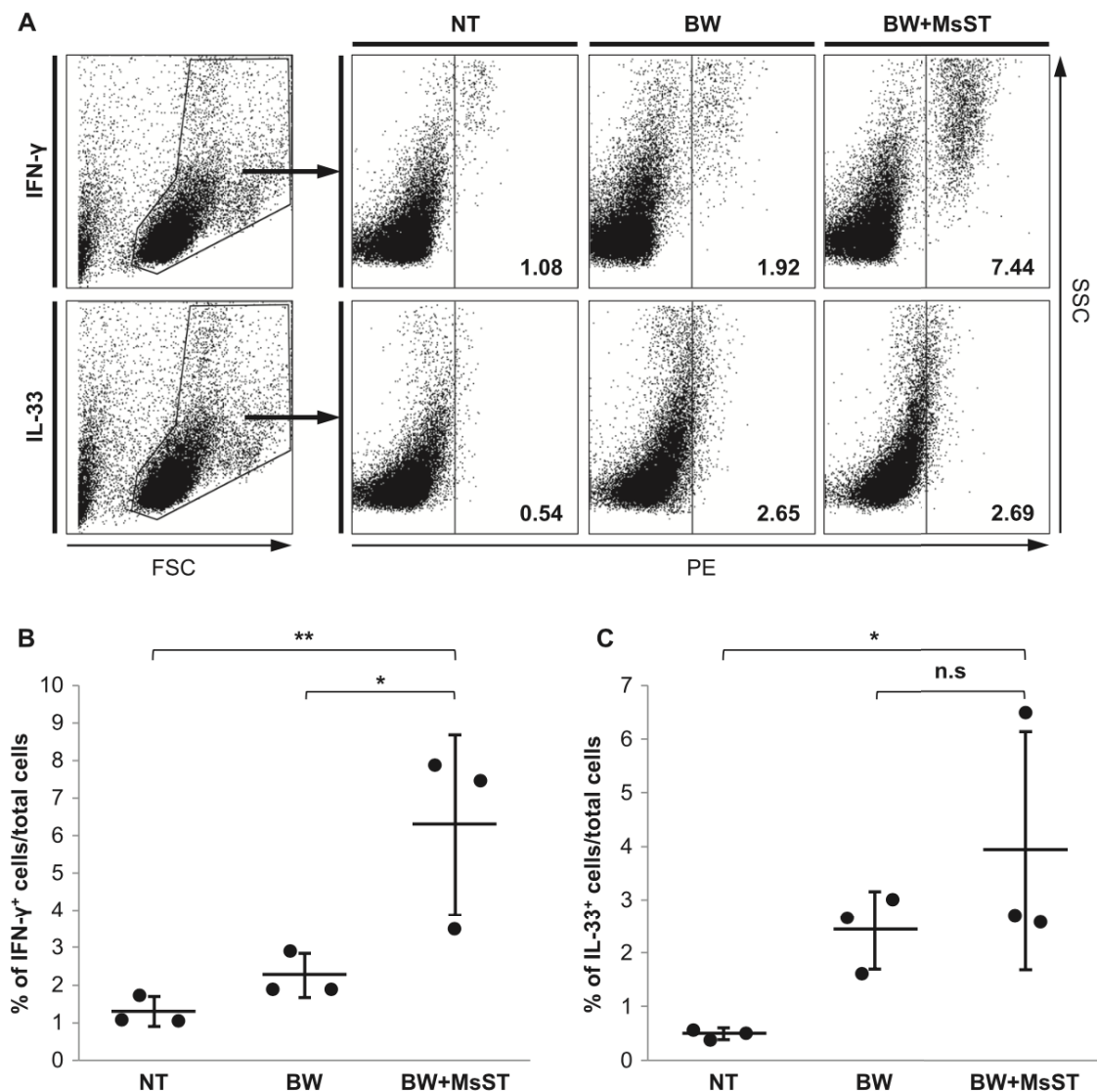


Fig. 2-5 Proportions of interferon (IFN)- γ^+ and interleukin (IL)-33 $^+$ cells in the spleens. Flow cytometric analysis (A) was performed to determine the proportions of IFN- γ^+ cells (B) and IL-33 $^+$ cells (C). Representative fluorescent-activated cell sorter (FACS) plots gated on IFN- γ^+ cells and IL-33 $^+$ cells (A). Forty-five minutes following the antigen challenge, mouse spleens were collected, and splenic cells were isolated and stained with anti-IFN- γ and -IL-33 antibodies. The results are presented as the mean \pm SE ($n = 3$) from three independent experiments with similar results. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ for the indicated group(s). n.s., not significant. The figure is taken from Yamamoto et al. (84).

2-4 考察

本研究ではマウスのアナフィラキシーモデルを作出するために、IL-33およびIFN- γ 産生を誘導するアジュバントとして乳酸菌に由来するCpG ODNであるMsSTを用いた。以前のマウスを用いた研究では、アナフィラキシーにはIgE依存的経路と非依存的経路が関連することが示されている(88, 89)。前者の経路では、I型アレルギーはヒスタミンやプロスタグランジンD₂、ロイコトリエン、MCP-1を産生する肥満細胞を活性化し、結果としてアナフィラキシーに導くTh2サイトカインおよびIgEにより惹起される(90, 91)。後者の経路では、アナフィラキシーはIgG産生を介して好塩基球やマクロファージから放出される血小板活性化因子(PAF)により誘導される。PAFは喘息、アナフィラキシーおよびアテローム性動脈硬化症のような重篤な炎症疾患の発症において役割を果たす生理活性を有する脂質メディエーターである。本研究では、IgE産生はMsSTにより減少したが、一方でMCP-1やIgG₁産生量は変化せず、IgG_{2a}産生量が有意に増加した(Fig. 2-4)。Kulisらは、ピーナッツ感作マウスにおけるClass B CpG ODNの投与はMCP-1およびTh2系サイトカイン産生抑制とピーナッツ特異的IgG_{2a}およびIFN- γ 産生促進を通してアナフィラキシー症状を抑制することを報告している(32)。本研究結果ではMsSTの投与によりIgG_{2a}が増加したことは一致するが、MCP-1は抑制されず、アナフィラキシー症状においては悪化が確認された。これらの応答への違いはClass B CpG ODNとは異なるMsSTの配列のためであると考察する。MsSTは乳酸菌のゲノムに由来するCpG ODNであり、IL-33およびIFN- γ を強力に誘導する(45, 57)。Komai-Komaらは以前、IL-33はアナフィラキシーの発達および肥満細胞の脱顆粒に関わることを報告している(75)。対照的にIFN- γ はTh1細胞や活性化したナチュラルキラー細胞により産生され、マクロファージの活性化や病原菌の排除に役割を果たす(92)。一般的にIFN- γ はTh1細胞が媒介するアレルギー疾患の抑制を支持する(93)。しかしながらIFN- γ はCD11b⁺およびCD11c⁺細胞におけるPAF生成を増強する(94, 95)。また本研究では、BW+MsST群において脾臓の肥大(脾腫)が確認された(Fig. 2-3)。自然免疫細胞は脾腫の誘導に関与するため、MsSTが感作マウスにおいてTh1型免疫応答と名付けられる自然免疫応答を活性化することに関与すると予測した。

近年では、肥満細胞や好塩基球を選択的に除去して作出されたアナフィラキシーモデルマウスがいくつか報告されている(96-98)。このモデルマウスを用いて、Reberらはピーナッツ誘導アナフィラキシーでは好塩基球よりも肥満細胞がより重要な役割を果たしていることを発見している(99)。アナフィラキシー症状の重篤度はIgEと抗原結合親和性との差に依存すると考えられている。しかしながら、Starkhammarらは、TLR9のリガンドであるCpG ODNのようなTLRを刺激することによりアレルギー症状が悪化することを示し、様々な細胞が悪化に関わることを証明した(14)。TLRsのように、自然免疫を活性化するシ

グナルが獲得免疫の悪化に関与する詳細なメカニズムの解明は、アレルギーモデルの開発だけでなく、新たなアジュバント開発戦略において重要な役割を担っている。今後は、種々の食物抗原との組み合わせで得られる MsST のアジュバント活性をこれらの視点から研究することを課題としたい。

第三章

血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを
誘導するオリゴ核酸の発見と
マウス敗血症軽減効果の検討

3-1 緒言

敗血症は感染症への過剰な免疫応答であり、高い疾病率および死亡率を有する命を脅かす疾患である。敗血症では炎症応答および血液凝固が特徴的であり、その結果、重篤な臓器障害を引き起こし、最悪の場合死に至ることもある(100)。患者数は世界で年間約 2,700 万人おり、そのうち約 800 万人が死亡している（日経メディカルオンライン / 敗血症治療の現在地）。TLR のうち、TLR4 はグラム陰性菌に由来する LPS を認識し、マクロファージや DC から TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ および IL-12 のような炎症性サイトカイン産生を誘導する。しかしながら、過剰なサイトカイン産生は致死的なエンドトキシンショックや敗血症を惹起する“サイトカインストーム”を生じる(23, 24)。近年、敗血症の薬剤候補として臨床フェーズ II および III まで進んでいるものが 2 つ存在する(101, 102)。1 つ目はエリトラン（Eritoran）といい、ナノ病原性の *Rhodobacter sphaeroides* に由来する lipid A の合成アナログであり、MD-2 に結合する LPS を中和する(101, 103)。2 つ目は TAK-242 といい、TLR4 の細胞内ドメインにおける Cys⁷⁴⁷ 残基と特に相互作用し、その結果自然免疫へのアダプター分子の動員を阻害する(102, 104)。エリトランと TAK-242 の治療指数はグラム陰性菌に感染した患者では限られており、重篤な敗血症の患者では生存率の向上には至っていない(101, 102)。そのため、現在のところ敗血症に完全に有効な薬は存在せず早急な開発や知見の積み重ねが求められている(105)。

炎症性サイトカインの誘導のように様々な因子が敗血症やエンドトキシンショックの発症に関わっている。血小板活性化因子（PAF）はエンドトキシンショックや敗血症のような炎症の誘導において重要な役割を果たすリン脂質である(106)。PAF は血小板凝集や活性化を誘導し、播種性血管内凝固症候群（disseminated intravascular coagulation, DIC）や敗血症に関与する(107-109)。さらに PAF は炎症において TNF- α のような免疫学的メディエーターの合成や放出を促進する(110, 111)。Jacob らは近年、PAF のマウスへの投与は急性の致死を誘導することを示した(112)。循環する内在性の PAF はリン脂質酵素である PAF アセチルヒドロラーゼ（PAF acetylhydrolase, PAF-AH）により制御されている。LPS 誘導致死ショックや盲腸穿孔（CLP）モデルでは、リコンビナント PAF-AH（rPAF-AH）は炎症応答を抑制することで生存率を改善する(113)。PAF-AH および rPAF-AH はまた敗血症や多臓器不全患者における臨床フェーズ II 試験で生存率を改善することが示されている(114)。そのために、PAF-AH は敗血症やエンドトキシンショックの治療標的分子として考えられている。

ODN と敗血症やエンドトキシンショックとの関連についてはいくつかの報告がある。まず、Rice らは CLP モデルに Class B CpG ODN を投与し、IL-17 を介して生存率を改善することを報告している(115)。Gao らは CLP モデルへの Class B CpG ODN 投与により心臓機能障害を向上することを報告している(116)。Shirotta らは iODN の一つである A151 をエンドトキシンショックモデルマウスに投与す

ると、STAT1およびSTAT4のリン酸化やLPSにより誘導されるIFN- β により活性化されるシグナルカスケードを阻害し、エンドトキシンショックを抑制することを報告しているが、同時にClass B CpG ODNの投与ではエンドトキシンショックを悪化することを報告している(24)。このようにODNと敗血症やエンドトキシンショックとの関連は、使用したモデルやODNの違いにより様々である。しかしながら、PAF-AHを作用機序として敗血症やエンドトキシンショックを改善するODNの報告はなく、ODNがPAF-AHを誘導するかどうかは非常に興味深いところである。そこで本研究では、まずPAF-AHを誘導するCpG ODNをスクリーニングした。次に、スクリーニングにより得られたCpG ODNを用いて、PAFおよびLPSを投与することにより誘導される敗血症およびエンドトキシンショックモデルマウスへの影響を検証した。

3-2 材料および方法

3-2-1 倫理的承認

全ての動物実験は、「信州大学動物実験等実施規程」に従い、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：280029）。

3-2-2 試薬

実験にはとくに断りの無い限り、（株）和光純薬工業（Osaka, Japan）製の特級あるいは一級試薬を用いた。また、水は全てミリ Q 水を用いた。エンドトキシンフリーの PS 結合 ODN は Integrated DNA Technologies（Coralville, IA, USA）あるいは Gene Design Inc（Osaka, Japan）へ合成を委託した。PS 結合 ODN は PBS で溶解し、小径 0.22 μm のマイクロフィルター（02927601, アドバンテック東洋株式会社, Tokyo, Japan）で濾過した。本研究で使用した CpG ODN 1585（CpG-A₁₅₈₅）、CpG ODN 1826（CpG-B₁₈₂₆）、CpG ODN 2395（CpG-2395）、GpC ODN1612（Ctr₁₆₁₂）、GpC ODN1585（non-CpG-A₁₅₈₅）および iODN_{H154} の配列は Table 3-1 に示した。*Escherichia coli* 0127:B8 由来の LPS は Sigma-Aldrich（L3129-100MG, St. Louis, MO, USA）より購入した。Methyl arachidonyl fluorophosphonate（MAFP）および PAF C-16 は Cayman Chemical Co.（70660, Ann Arbor, MI, USA; 60900）より購入した。Polyinosinic acid（Poly(I:C)）は InvivoGen（tlrl-pic, San Diego, CA, USA）より購入した。リコンビナントマウス IFN- α （rmIFN- α ）は BioLegend（752802, San Diego, CA, USA）より購入した。

3-2-3 マウス

6 週齢の BALB/c マウス（メス）および ICR（Swiss albino）マウス（オス）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。

3-2-4 細胞および細胞培養

8 週齢の BALB/c 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 μm , 352340, 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 を用いて 1×10^6 cells/mL に調製し、1 mL/well (1×10^6 cells) で 24well プレート (142475, Nalge Nunc International K. K., Tokyo, Japan) に播種した。続いて細胞を 0.01-10 μ M の CpG ODN、0.01-10 μ g の poly(I:C) あるいは 0.01-1 ng の rmIFN- α を添加し、24 hr 培養した (Fig. 3-1, 3-2)。培養後、細胞および培養上清を回収し、Real-time 定量的 PCR (qPCR) および PAF-AH 酵素活性の測定にそれぞれ用いた。また 3 μ M の CpG-A₁₅₈₅ で 24 hr 培養後、10 ng/mL の LPS で 6 hr 培養し、qPCR あるいは 24 hr 培養し、ELISA の測定にそれぞれ用いた (Fig. 3-5)。

8 週齢の BALB/c マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、5 mL の冷 PBS 入り 18G 注射針 (1-4909-01, TERUMO Corporation, Tokyo, Japan) と 5 mL テルモシリンジ (SS05SZP, TERUMO Corporation) を用いて腹腔内マクロファージを回収した。1,500 rpm、5 min 遠心し、完全 RPMI 1640 で細胞懸濁液とした。脾臓細胞懸濁液と同様に生細胞数を測定した。完全 RPMI 1640 を用いて 1×10^5 cells/mL に調製し、1 mL/well (1×10^5 cells) で 24well プレートに播種した。続いて細胞を 3 μ M の CpG-A₁₅₈₅ で 24 hr 培養後、培養後、細胞および培養上清を回収し、qPCR および PAF-AH 酵素活性の測定にそれぞれ用いた (Fig. 3-1)。

3-2-5 PAF 誘導致死ショックモデル

実験スケジュールは Fig. 3-3A に示した。ICR マウスの生存率への PAF の影響を調べるため、6 週齢 ICR マウスを PAF 群、CpG-A₁₅₈₅+PAF 群および CpG-A₁₅₈₅+PAF+MAFP 群 (n=8) に群分けした。ICR マウスに 50 μ g の PAF と 0.1 % のヒト血清アルブミン (013-10501, (株) 和光純薬工業) を含む 0.5 mL の PBS を i.p.により投与し、PAF によるショックを誘導した。PAF 投与の 1、3 および 5 day 前に、50、100 あるいは 300 μ g の CpG-A₁₅₈₅ を i.p.により投与した。MAFP は CpG-A₁₅₈₅ の投与 20 min 前に 1 mg/kg で i.p.投与した。PAF 投与後、60 min まで生存を観察した。

3-2-6 LPS 誘導致死ショックモデル

実験スケジュールは Fig. 3-6A に示した。7 週齢 BALB/c マウス LPS 群、CpG-A₁₅₈₅+LPS 群および CpG-A₁₅₈₅+LPS+MAFP 群 (n=8) に群分けした。BALB/c マウスに 750 μ g の LPS を i.p.により投与し、エンドトキシンショックを誘導した。LPS 投与の 3 hr 前に 300 μ g の CpG-A₁₅₈₅ を i.p.により投与した (Fig. 3-6)。MAFP は CpG-A₁₅₈₅ の投与 20 min 前に 5 mg/kg で i.p.投与した (Fig. 3-7)。LPS 投与後、3 hr ごとに 24 hr まで生存を観察した。また同時に体温を NTC 直腸温計 (Tateyama Kagaku Industry Co., Ltd., Toyama, Japan) を用いて測定した。また、LPS 投与の 1、4 および 12 hr 後に尾静脈あるいは心臓よ

り採血を行い、2,000×g、15 min、4 °Cで遠心し、血清を調製した。調製した血清は PAF-AH 活性の測定に用いた。

3-2-7 心臓からの血液の回収

PAF 投与の 10 min 後、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、5 min 以内に 18G 注射針（1-4909-01, TERUMO Corporation, Tokyo, Japan）と 10 mL テルモシリンジ（02921861, TERUMO Corporation）を用いて心臓から回収できる最大量の血液を回収した。その後、SEFI IBA-200 Calibration（AS ONE Corporation, Osaka, Japan）を用いて、血液重量を測定した。容量（ml）はマウス血液に特異的な質量（1.035）を用いて計算した。凝血の進行は回収された血液の量により査定した。血液重量の測定後、2,000×g、15 min、4 °Cで遠心し、血清を調製した。調製した血清は PAF-AH 活性の測定に用いた。

3-2-8 病理組織検査

腎臓、肝臓（方形葉）および脾臓は 10 %中性ホルマリン緩衝液（068-01663）を用いて固定した。その後、各組織はパラフィンで包埋し、薄切後、エオジン&ヘマトキシリン（HE）およびリントングステン酸ヘマトキシリン（PTAH）染色を行った。薄切および染色はバイオ病理研究所（Oita, Japan）に外注した。病理組織は光学顕微鏡を用いて解析した。フィブリンの蓄積範囲はイメージプロソフトウェア(Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA)を用いて解析した。

3-2-9 qPCR

CpG ODN および LPS で刺激した細胞から NucleoSpin[®] RNA (TaKaRa Bio Inc., Tokyo, Japan)を用いて total RNA を精製した。PrimeScript[®] RT Master Mix (RR037A, TaKaRa Bio Inc.)を用いて、100ng の total RNA から cDNA を合成し、EASY Dilution（9160, TaKaRa Bio Inc.）を用いて反応溶液を 20 倍希釈した。qPCR は Table 3-2 の通り実施した。mβ-actin、paf-ah2 および tnf-α 特異的プライマーは TaKaRa Bio Inc.より購入した。

3-2-10 ELISA

3-2-4 で得られた培養上清および 3-2-6 で得られた血清中の TNF-α および IL-6 濃度は、ELISA キット（TNF-α: 88-7324-22, eBioscience Inc., San Diego, CA, USA; IL-6: 88-7064-22, eBioscience Inc.）を用いて測定した。

3-2-11 PAF-AH 活性の測定

3-2-4 で得られた培養上清、3-2-5 および 3-2-6 で得られた血清中 PAF-AH 活性は PAF-AH assay kit (760901, Cayman Chemical Co.)(117)を用いて測定した。10 μ L のサンプルと 10 μ L の 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) を 96well プレートに添加した。200 μ L の基質溶液 (2-thio-PAF) を加えることにより、反応を開始し、2 min ごとにマイクロプレートリーダー (Bio-Rad, CA, USA) で 450 nm の吸光度を測定した。

3-2-12 統計処理

統計解析は統計解析ソフトウェア (ystat2004.xls, Igakutosho Shuppan, Tokyo, Japan あるいは GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて実施した。全てのデータは一元配置分散分析で解析後、生存率解析、in vitro 試験における qPCR 解析および PAF-AH 活性、LPS 誘導エンドトキシンショック試験を除いて Student-Newman-Keuls (SNK) 検定を用いて解析した。生存率解析は log-rank 検定を用いて解析した。in vitro 試験における qPCR 解析および PAF-AH 活性、LPS 誘導エンドトキシンショック試験はスチューデント T 検定および Dunnett 検定を用いて解析した。有意水準 α は 0.05 を用いた。

Table 3-1 ODN sequences used in this study

Name	ODN class	Sequence 5' - 3'	Reference
CpG-A ₁₅₈₅	A class CpG ODN	G*GGGTCAACGTTGAG*G*G*G*G*G	(82)
non-CpG-A ₁₅₈₅	GpC ODN	G*GGGTCAAGCTTGAG*G*G*G*G*G	This study
CpG-B ₁₈₂₆	B class CpG ODN	T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*C*G*T*T	(83)
CpG-C ₂₃₉₅	C class CpG ODN	T*C*G*T*C*G*T*T*T*T*C*G*G*C*G*C*G*C*G*C*C	(84)
Ctr ₁₆₁₂	GpC ODN	G*C*T*A*G*A*G*C*T*T*A*G*G*C*T	(45)
iODN _{HI54}	inhibitory ODN	C*C*T*C*A*A*G*C*T*T*G*A*G*G*G*G	(35)

Asterisks (*): phosphorothioate bond

Table 3-2 Reaction solution and conditions for real-time quantitative PCR

Component of reaction solution	
SYBR Premix Ex Taq 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 $^{\circ}$ C	10 sec
95 $^{\circ}$ C	5 sec
60 $^{\circ}$ C	5 sec
45 cycle	
Dissociation	

3-3 結果

3-3-1 CpG-A₁₅₈₅ は TLR9 を介して強力に PAF-AH を誘導する

全てのCpG ODNがPAF-AHを誘導するかを調べるために、in vitro試験で脾臓細胞におけるCpG-A₁₅₈₅、CpG-B₁₈₂₆およびCpG-C₂₃₉₅の*paf-ah2* mRNA発現およびPAF-AH活性の誘導への影響を確認した。興味深いことにCpG-A₁₅₈₅のみが他のODNと比較して*paf-ah2* mRNA発現を有意に誘導した ($p < 0.01$) (Fig. 3-1A, 3-2A)。CpG-A₁₅₈₅により誘導される*paf-ah2* mRNA発現およびPAF-AH活性はiODNの一つであり、TLR9の特異的アゴニストであるH154 (iODN_{H154})により有意に抑制された(Fig. 3-1B)。非メチル化CpGジヌクレオチドを含むCpG-A₁₅₈₅はTLR9活性化を介して脊椎動物の免疫応答を惹起するため(33, 118)、CpGモチーフを持たないnon-CpG-A₁₅₈₅を用いて、CpG-A₁₅₈₅におけるCpGモチーフがCpG-A₁₅₈₅により誘導される*paf-ah2* mRNA発現に影響を及ぼすかを検証した。non-CpG-A₁₅₈₅はCtr₁₆₁₂と同様に*paf-ah2* mRNA発現を誘導しなかった (Fig. 3-1C)。加えて、CpG-A₁₅₈₅はCrt₁₆₁₂と比較してより強力なPAF-AH活性を示したが、一方でiODN_{H154}による阻害やnon-CpG-A₁₅₈₅ではCtr₁₆₁₂と比較して有意なPAF-AH活性を示さなかった (Fig. 3-1D)。腹腔内マクロファージを用いた実験においても同様の結果を示した (Fig. 3-1E, F)。

CpG ODNの中でも特にCpG-AはIFN- α の誘導剤であることが知られている(31)。IFN- α が*paf-ah2* mRNA発現の誘導に関与するかを確かめるため、IFN- α の誘導剤であるPoly(I:C)とrmIFN- α の*paf-ah2* mRNA発現の誘導への影響を検証した。Poly(I:C)とrmIFN- α は*paf-ah2* mRNA発現を誘導しなかった (Fig. 3-2B, C)。まとめるとこれらの結果は、CpG-A₁₅₈₅のみがIFN- α ではなくTLR9を介して強力にPAF-AHを誘導し、その産生はマクロファージに由来することを示唆している。

3-3-2 CpG-A₁₅₈₅はPAF誘導致死ショックからマウスを保護する

PAF単独の投与はマウスにおいて突然死を誘導することが報告されている(112)。さらにPAFは敗血症症状であるDICに関与することが報告されている(109, 119)。そのために、CpG-A₁₅₈₅がPAF誘導致死ショックからマウスを保護するかどうかを検証した。PAFの投与1、3および5 day前に50、100あるいは300 μ gのCpG-A₁₅₈₅をi.p.により投与した (Fig. 3-3A)。PAF群では20 min以内に全てのマウスが死亡することと比較して、300 μ gのCpG-A₁₅₈₅+PAF群では有意に死亡率を改善した ($p < 0.0001$) (Fig. 3-3B)。一方で、50および100 μ gのCpG-A₁₅₈₅+PAF群では死亡率の改善は認められなかった (Fig. 3-3B)。次にCpG-A₁₅₈₅の効果がPAF-AHに依存するかどうかを検証するために、PAF-AHの阻害剤であるMAFPを用いた。In vitro試験において、単球やトロンビンで刺激したヒト冠状動脈内皮細胞にMAFPを用いることで、PAF-AHの減少に伴いPAFが蓄積

することが示されている(120, 121)。またin vivo試験では、LPS誘導PAF-AH活性がMAFPにより抑制されることも報告されている(117)。期待したように、CpG-A₁₅₈₅+PAF+MAFP群では生存率を40 %まで減少させた (Fig. 3-3B)。これらをまとめるとCpG-A₁₅₈₅はPAF-AHに依存してPAF誘導突然死からマウスを保護することが示唆された。

3-3-3 CpG-A₁₅₈₅はPAF誘導血液凝固を改善する

3-3-2で認められた改善効果の作用機序を検証した。NT群と比較して、重篤な凝血がPAF群で認められた (Fig. 3-4A)。PAFは血小板凝集を促進することが報告されている(107)。そのため、心臓の血液量を測定することで血小板凝集を検証した。PAF群における心臓の血液量はNT群と比較して有意に減少し ($p<0.01$)、一方でCpG-A₁₅₈₅+PAF群における心臓の血液量は改善した ($p<0.01$) (Fig. 3-4B)。HEおよびPTAH染色の結果では、NT群と比較してPAF群では小葉間静脈から腎小体に増加したフィブリンおよびフィブリン血栓が認められた (Fig. 3-4C, D)。PAF群と比較して、CpG-A₁₅₈₅+PAF群ではフィブリンおよびフィブリン血栓が有意に減少した (Fig. 3-4C-E)。さらにPAF群と比較して、CpG-A₁₅₈₅+PAF群では血清PAF-AH活性が有意に増加した ($p<0.01$) (Fig. 3-4F)。これらの結果はCpG-A₁₅₈₅がPAF-AH活性を介してPAF誘導フィブリン形成を改善したことを示唆している。

3-3-4 CpG-A₁₅₈₅はTNF- α を抑制する

PAFはin vitro試験でTNF- α 分泌の制御において重要な役割を果たすことが示されている(122)。そこで、CpG-A₁₅₈₅により誘導されたPAF-AHがLPS刺激により生成された炎症応答にどのような影響を及ぼすかを検証した。CpG-A₁₅₈₅はLPS誘導*tnf- α* mRNA発現およびタンパク質産生量を減少した (Fig. 3-5A, B)。これらの結果はCpG-A₁₅₈₅誘導PAF-AHが炎症応答を制御しうることを示唆している。

3-3-5 CpG-A₁₅₈₅はLPS誘導エンドトキシンショックからマウスを保護する

CpG ODNをエンドトキシンショックおよび敗血症に用いた以前の研究では、Class B CpG ODNがエンドトキシンショックモデルマウスにおける生存率を減少する、あるいは敗血症に誘導される死亡率を軽減することが示されている(24, 115, 123)。しかしながら、CpG ODNのエンドトキシンショックへの影響は未だ不明である。加えて、in vitroおよびin vivo試験において、LPSはPAF合成およびPAF誘導疾患に関与することが示されている(124, 125)。そのため、Class A CpG ODNがLPS誘導エンドトキシンショックからマウスを保護するかどうかを検証するため、LPS刺激3 hr前にCpG-A₁₅₈₅をi.p.によりマウスに投与した (Fig. 3-6A)。LPS群と比較して、CpG-A₁₅₈₅+LPS群は24 hrの死亡率を有意に改善し

た($p < 0.0005$) (Fig. 3-6B)。加えて、CpG-A₁₅₈₅+LPS群はエンドトキシンショックの特徴である低体温症を改善した (Fig. 3-6C)。しかしながら、CpG-A₁₅₈₅+LPS+MAFP群ではCpG-A₁₅₈₅投与により改善した低体温症を悪化した (Fig. 3-7B)。また、LPS群と比較して、CpG-A₁₅₈₅+LPS群はLPS刺激12 hr後 (CpG-A₁₅₈₅投与の15 hr後) の血清PAF-AH活性を有意に増加した($p = 0.0199$) (Fig. 3-6D)。さらにLPS群と比較して、CpG-A₁₅₈₅+LPS群はLPS刺激12 hr後の血清IL-6およびTNF- α 産生を有意に抑制した(IL-6: $p = 0.0001$; TNF- α : $p = 0.0001$) (Fig. 3-6E, F)。特にCpG-A₁₅₈₅+LPS群における血清TNF- α 産生はLPS群よりも有意に減少した(CpG-A₁₅₈₅+LPS群: 45.4 ± 17.6 pg/ml; LPS群: 190 ± 53.6 pg/ml, $p < 0.001$)。これらの結果はCpG-A₁₅₈₅がLPS誘導エンドトキシンショックからマウスを保護することを示唆している。

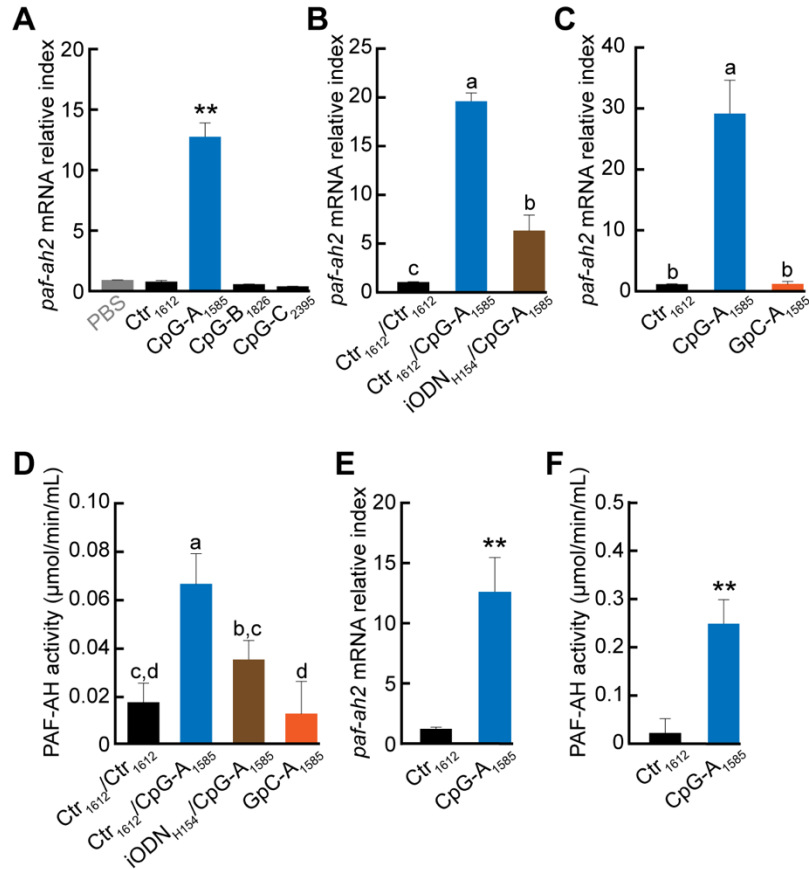


Fig. 3-1 Effect of CpG oligodeoxynucleotide (ODN) on platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) gene and enzymatic activity. Splenocytes or peritoneal macrophages were incubated with 3 μM CpG ODN, 3 μM CpG ODN 3 hr after iODN_{H154} treatment, or non-CpG-A₁₅₈₅. After 24 hr CpG ODN stimulation, the cells or supernatant were collected and used for PAF-AH expression or activity determination by quantitative PCR or PAF-AH assay kit, respectively. *Paf-ah2* mRNA expression by (A) CpG-A₁₅₈₅, CpG-B₁₈₂₆, and CpG-C₂₃₉₅; (B) iODN_{H154} inhibition; (C) non-CpG-A₁₅₈₅; and (D) PAF-AH activity in splenocytes. (E) *paf-ah2* mRNA expression and (F) PAF-AH activity in peritoneal macrophages. Data are presented as the mean ± SD. ** $p < 0.01$, significant differences vs. phosphate-buffered saline and/or Ctrl₁₆₁₂. Values with different letters (i.e., a, b, c, and d) represent significant differences ($p < 0.05$). The figure is taken from Yamamoto et al. (100).

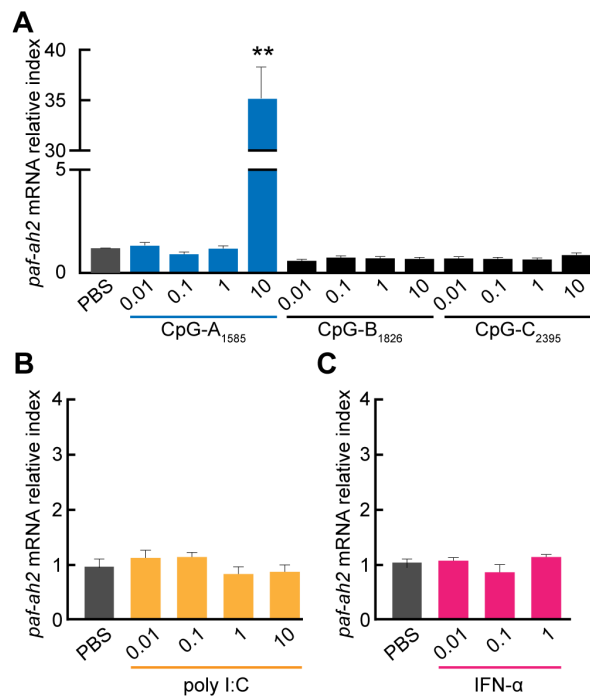


Fig. 3-2 Effect of CpG-A₁₅₈₅, CpG-B₁₈₂₆, CpG-C₂₃₉₅, and interferon (IFN)- α dose on platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) mRNA expression. Splenocytes were incubated with 0.01–10 μ M CpG oligodeoxynucleotide (ODN), 0.01–10 μ g/ml poly(I:C), or 0.01–1 ng/ml rmIFN- α . After 24 hr CpG ODN stimulation, the cells were collected and used for PAF-AH expression determination by quantitative PCR. *Paf-ah2* mRNA expression by (A) CpG-A₁₅₈₅, -B₁₈₂₆, and -C₂₃₉₅ dose, (B) poly(I:C) dose, and (C) rmIFN- α dose in splenocytes. Data are presented as the mean \pm SD. ** $p < 0.01$, significant differences compared to phosphate-buffered saline (PBS). The figure is taken from Yamamoto et al. (100).

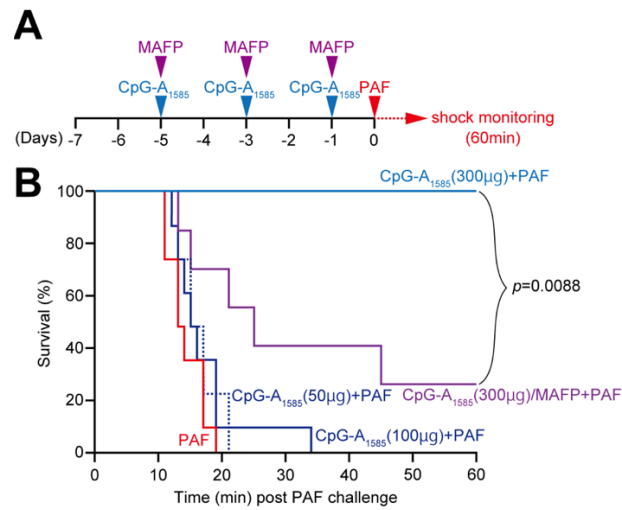


Fig. 3-3 Protective effect of CpG-A₁₅₈₅ on platelet-activating factor (PAF)-induced lethal shock. **(A)** Experimental schedule to examine the effect of CpG-A₁₅₈₅ on PAF-induced sudden death. After 1 week of rearing, ICR mice were injected with 50, 100, or 300 μg CpG-A₁₅₈₅ with or without methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) (1 mg/kg) 1, 3, and 5 days before receiving 50 μg PAF containing 0.1 % human serum albumin. **(B)** Survival was monitored for 60 min. n= 8 mice per group. The figure is taken from Yamamoto et al. (100).

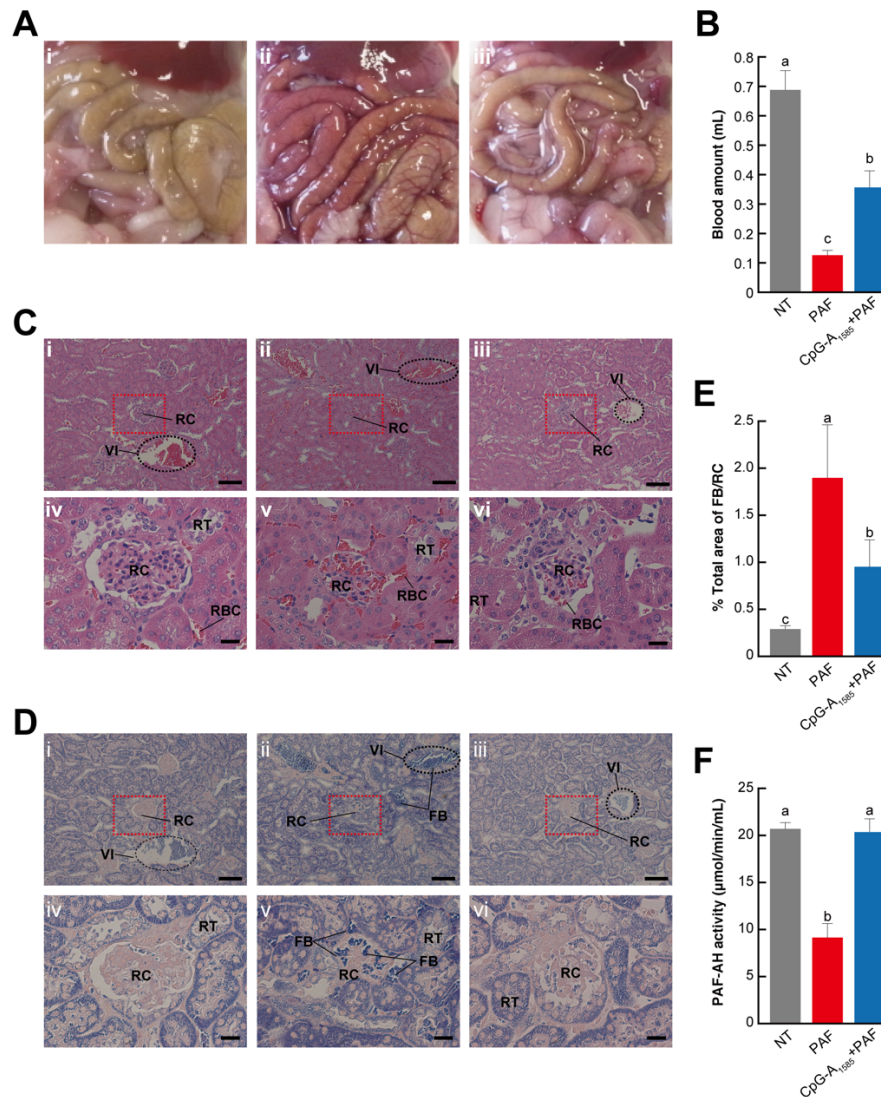


Fig. 3-4 Mechanism of platelet-activating factor (PAF)-induced lethal shock ameliorated by CpG-A₁₅₈₅. ICR mice were injected with 300 μ g CpG-A₁₅₈₅ for 1, 3, and 5 days before receiving 50 μ g PAF containing 0.1 % human serum albumin. Mice were then euthanized within 10 min after PAF injection. **(A)** Representative image of the abdominal cavity of (i) non-treated (NT), (ii) PAF-treated, and (iii) CpG-A₁₅₈₅ + PAF-treated mice. **(B)** Heart blood volume. **(C)** Hematoxylin-eosin staining, which shows polycythemia and morphological changes in the kidney. (i) NT, (ii) PAF-treated, and (iii) CpG-A₁₅₈₅ + PAF-treated mice. Scale bar = 100 μ m. (iv) NT, (v) PAF-treated, and (vi) CpG-A₁₅₈₅ + PAF-treated mice. Scale bar = 20 μ m. Fibrin thrombus is stained dark red. **(D)** Phosphotungstic acid hematoxylin staining, which shows fibrin accumulation in the kidney. (i) NT, (ii) PAF-treated, and (iii) CpG-A₁₅₈₅ + PAF-treated mice. Scale bar = 100 μ m. (iv) NT, (v) PAF-treated, and (vi) CpG-A₁₅₈₅ + PAF-treated mice. Scale bar = 20 μ m. Fibrin is stained dark blue. FB, fibrin; RBC, red blood cell; RC, renal corpuscle; RT, renal tubule; VI, interlobar veins. **(E)** The area of fibrin accumulation was determined by Image Processing Software, and the results are presented as the

mean \pm SE (n= 9 samples per group). **(F)** Serum platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in mice. n= 8 mice per group. Data are presented as the mean \pm SE. Values with different letters (i.e., a, b, and c) represent significant differences ($p < 0.05$). The figure is taken from Yamamoto et al. (100).

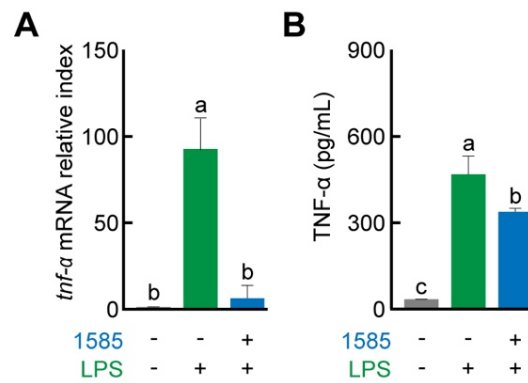


Fig. 3-5 Suppressive effects of CpG-A₁₅₈₅ on lipopolysaccharide (LPS)-induced tumor necrosis factor (TNF)- α production. Splenocytes were first incubated with 3 μ M CpG-A₁₅₈₅ and then incubated with LPS (10 ng/ml). After LPS stimulation, the cells or supernatant was collected and used to evaluate *tnf-α* mRNA expression or TNF- α protein level by quantitative PCR or enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. **(A)** *tnf-α* mRNA expression and **(B)** TNF- α protein level in splenocytes. Data are presented as the mean \pm SE. Values with different letters (i.e., a, b, and c) represent significant differences ($p < 0.05$). The figure is taken from Yamamoto et al. (100).

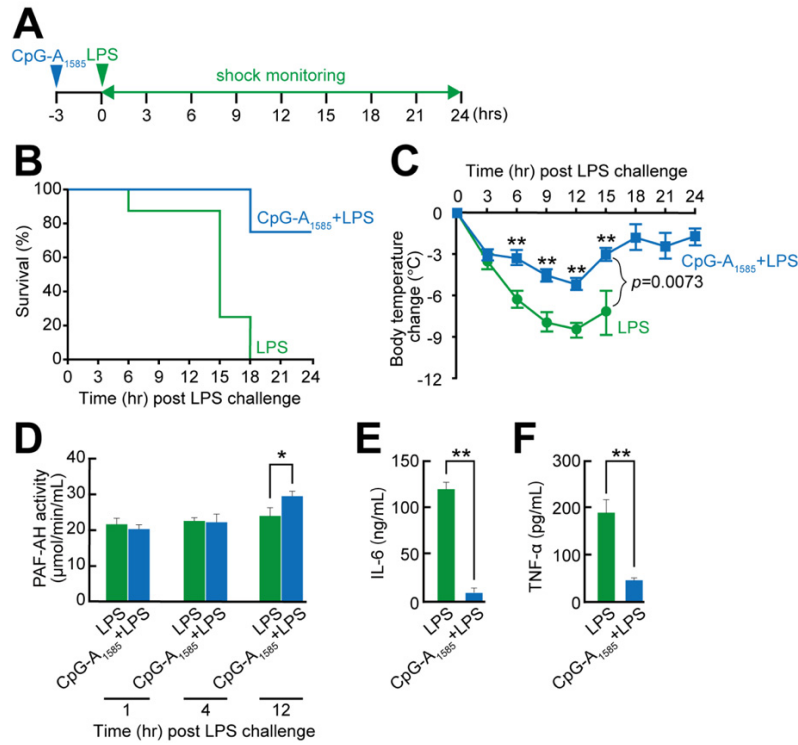


Fig. 3-6 Protective effect of CpG-A₁₅₈₅ on lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock. **(A)** Experimental schedule to examine the effect of CpG-A₁₅₈₅ on LPS-induced endotoxin shock. BALB/c mice were intraperitoneally injected with 300 μg CpG-A₁₅₈₅ 3 hr before challenge with 750 μg LPS. **(B)** Survival and **(C)** changes in body temperature were monitored for 24 hr. **(D)** Kinetics of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) activity in serum collected from the tail vein after receiving 300 μg CpG-A₁₅₈₅ and 750 μg LPS. **(E)** Serum interleukin (IL)-6 and **(F)** tumor necrosis factor (TNF)-α levels in mice that received LPS with or without 300 μg CpG-A₁₅₈₅ 12 hr after LPS challenge. $n=8$ mice per group. Data are presented as the mean \pm SE. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, significant differences between the LPS and CpG-A₁₅₈₅ + LPS groups. The figure is taken from Yamamoto et al. (100).

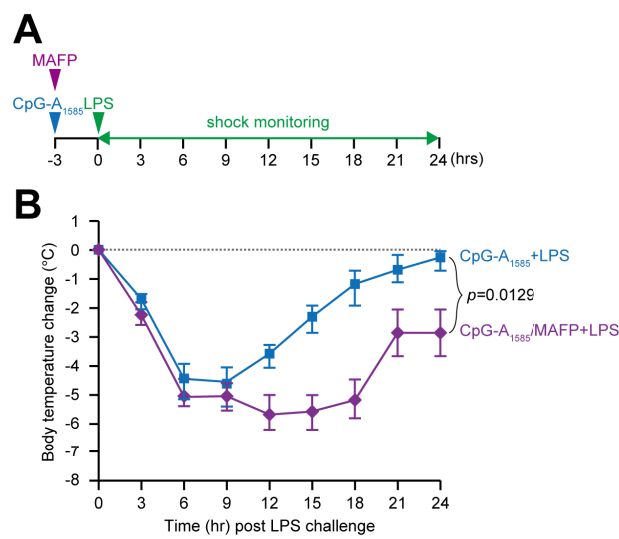


Fig. 3-7 Effect of a platelet-activating factor acetylhydrolase inhibitor on amelioration of lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock by CpG-A₁₅₈₅. **(A)** Experimental schedule to examine the effect of methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP) on LPS-induced endotoxin shock ameliorated by CpG-A₁₅₈₅. BALB/c mice were intraperitoneally injected with 5 mg/kg MAFP for 20 min before receiving 300 μ g CpG-A₁₅₈₅. After 3 hr, the mice were challenged with 750 μ g LPS. **(B)** Changes in body temperature within 24 hr. $n=8$ mice per group. Data are presented as the mean \pm SE. The figure is taken from Yamamoto et al. (100).

3-4 考察

2016年、敗血症および敗血症ショックの定義が2001年以来、15年ぶりに改定され、敗血症は「感染に対する宿主生体反応の調節不全で、生命を脅かす臓器障害」、敗血症ショックは「敗血症の部分集合であり、実施的に死亡率を上昇させる重度の循環・細胞・代謝の異常を呈するもの」と定義された(126)。本研究では、CpG-A₁₅₈₅が抗炎症応答およびDICの改善を通して敗血症性ショックおよびエンドトキシンショックを緩和することを提唱する (Fig. 3-3, 3-4, 3-6, 3-7, 3-8)。

本研究では、CpG-A₁₅₈₅がPAF誘導急性致死を改善し、この効果はPAF-AHの阻害剤であるMAFPにより抑制することを示した (Fig. 3-3, 3-8)。ChenらはMAFPはPAF-AHの強力で不可逆的な阻害剤であると示している(120)。加えて、WuらもまたPAF-AHの特異的阻害剤としてMAFPを使用し、MAFPがLPS誘導肺炎モデルにおける血漿PAF-AH活性を阻害することを示している。さらにWuらはこの見解はPAFに関与することを強く支持している(117)。実験的な敗血症のマウスモデルでは、急性致死はPAFにより誘導されたDICにより惹起される。DICは凝血および線維素溶解の病理学的調節不全により惹起する(127)。本研究で減少した心臓由来血液量とHEおよびPTAH染色の結果は、特にフィブリンの存在によりDICの特徴を示している(119) (Fig. 3-4B-D)。CpG-A₁₅₈₅はPAFにより凝固する血液およびフィブリン蓄積を改善し (Fig. 3-4B-E)、血清PAF-AH活性を有意に増加した (Fig. 3-4F)。以前の研究では、PAFアンタゴニストの投与でDIC症状が改善することが示されている(109)。すなわちPAF阻害剤はDICを改善することを示唆している。PAF-AHはPAFの分解物であるlyso-PAFを作り出すことにより間接的にDICを改善する能力を有している。そのため、これらの結果はCpG-A₁₅₈₅がPAF-AHを介してPAFを分解し、マウスにおけるPAF誘導突然死を改善することを示している (Fig. 3-8)。

マウスにおける敗血症の実験モデルは、(a) LPS注射 (エンドトキシンショック)モデル、(b) cecal ligation and puncture (CLP)やcolon ascendens stent peritonitis (CASP)のような内在性保護バリアーの改造 (破壊)モデル、(c) 外因性細菌の投与モデルの3種類のカテゴリーに分類されている。LPS注射モデルは、敗血症における初期の臨床特徴と類似した全身炎症を表現している(128)。本研究では、LPS注射モデルを用い、Class A CpG-ODNがLPSにより誘導されるエンドトキシンショックを改善することを示した (Fig. 3-6, 3-7)。

Class B CpG ODNは以前、CLPモデルにおいて、IL-17を介して生存率を改善することが報告されている(115)。またCLPモデルへのClass B CpG ODN投与により心臓機能障害を向上することが報告されている(116)。さらにClass B CpG ODN投与は好中球の蓄積を刺激し、細菌の排除を促進することで生存率を改善することが報告されている(123)。一方で、rPAF-AHの投与は細菌の排除を増加し、侵入してきた細菌をマクロファージが貪食する能力を増強することが報告

されている(113)。本研究で用いたCpG-A₁₅₈₅は強力にPAF-AHを誘導するため、CLPおよびCASPにおいて誘導される細菌感染に対しても有効である可能性がある。そのため、これらモデルマウスを用いて、PAF-AHを強く誘導するClass A CpG-ODNによる様々な敗血症の研究が今後の課題である。

LPS、TNF- α 、IL-1、一酸化窒素(NO)、PAF、Braun's lipoprotein (BLP)およびhigh-mobility group box 1 protein (HMGB-1)のような様々な炎症関連因子が敗血症へと導く炎症を促進する(129, 130)。抗TNF抗体はLPS誘導致死ショックから用量依存的にマウスを保護することが報告されている(131)。そのため、TNF- α の制御は敗血症および敗血症性ショックの強力な治療戦略である。加えて、カルシトニン遺伝子関連ペプチドおよび下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチドI型受容体のアゴニストはLPS誘導TNF- α を抑制し、エンドトキシンショックの生存率を改善することが報告されている(132, 133)。本研究結果はこれらの報告を支持している。さらに*Escherichia coli*の構成膜の成分であり炎症因子であるBLPはLPSのようにTLR2を介して内毒素症を刺激する。このBLPによってもPAF合成は誘導される(129)。このためにCpG-A₁₅₈₅はLPSおよびBLPの両方により誘導される内毒素症にも有効かもしれない。

マクロファージはPAF-AHを分泌することが知られているために(134, 135)、本研究では、腹腔内マクロファージおよび脾臓細胞を用いてCpG-A₁₅₈₅により誘導されるPAF-AHを検証した(Fig. 3-1D, F)。さらにいくつかの研究グループはCpG-A₁₅₈₅の前処理により誘導されるLPSの強力な抗炎症効果として知られるTLR4/9クロストランスを報告している(24, 136, 137)。興味深いことに、本研究ではCpG-A₁₅₈₅の前処理が敗血症およびエンドトキシンショックモデルにおける早期のTNF- α 産生においてPAF-AHを有意に増加することを示している。加えて、PAF-AHの阻害剤はPAF誘導急性致死モデルにおいて生存率を減少することを明らかにした。入院患者は免疫力が弱っているために敗血症性ショックに陥るリスクが非常に高い。また敗血症は一度罹患すると生存率の低い疾患である。CpG-A₁₅₈₅は敗血症の予防だけでなく、免疫応答の増強においても期待できる免疫増強型分子である。本研究では、敗血症およびエンドトキシンショックにおけるPAFとその機能性の重要性を検証し、CpG-A₁₅₈₅を新たな敗血症の予防・軽減のツールとして提供するものである。

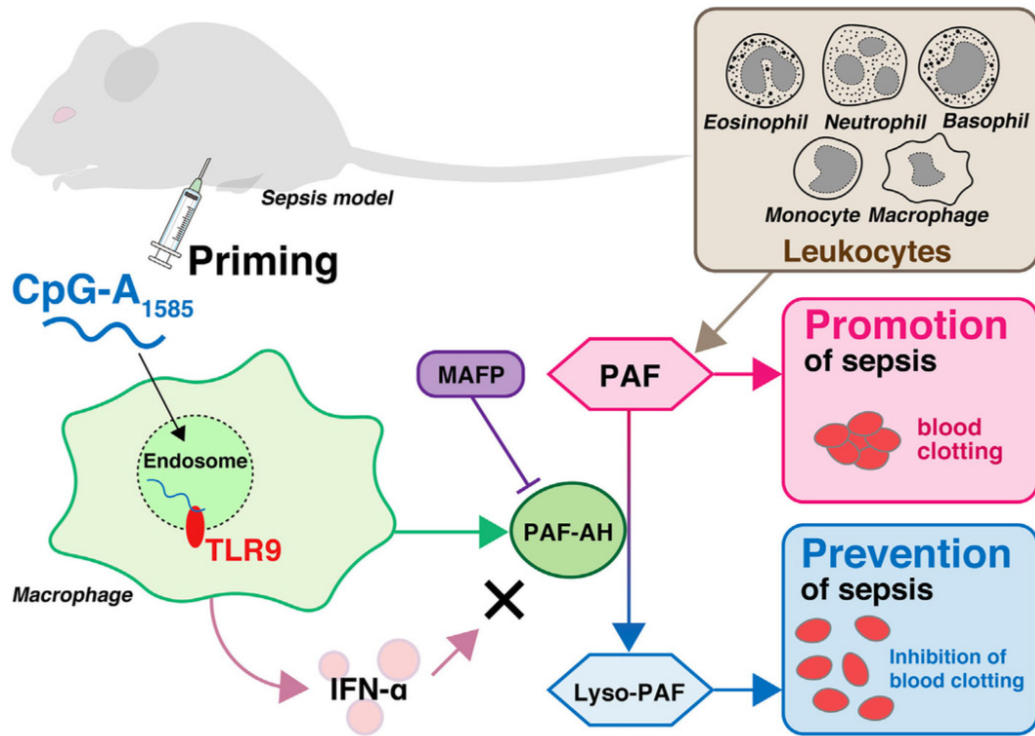


Fig. 3-8 Overview of sepsis prevention by CpG-A₁₅₈₅ priming. Leukocytes including macrophages, monocytes, eosinophils, neutrophils, and basophils produce platelet-activating factor (PAF), which plays a significant role in the pathogenesis of endotoxin shock and sepsis in response to invading pathogens. PAF is degraded into lyso-PAF by platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH), resulting in the deactivation of PAF. CpG-A₁₅₈₅ induces PAF-AH from splenocytes, especially macrophages, *via* a TLR9-dependent pathway. Although CpG-A₁₅₈₅ is a strong inducer of interferon (IFN)-α, CpG-A₁₅₈₅-induced IFN-α does not affect PAF-AH. CpG-A₁₅₈₅ inhibits PAF-induced blood clotting *via* induction of PAF-AH, and this effect is inhibited by a PAF-AH-specific inhibitor, methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP). The figure is taken from Yamamoto et al. (100).

第四章

総論

4-1 研究成果の概要

ODN の発見は 1980 年代まで遡る。1984 年、Tokunaga らは *Mycobacterium bovis* BCG 由来の水溶性成分をスクリーニングしている中、DNA が腫瘍に対して強力な抗腫瘍効果を発揮することを初めて発見した(138)。また Tokunaga らは *Mycobacterium bovis* BCG 由来の DNA が IFN- α および IFN- γ を誘導し、NK 細胞の強力な活性化剤となることを報告した(138)。それから 11 年後、Kreig らは細菌由来の CpG DNA が免疫細胞の 1 つである B 細胞の増殖および免疫グロブリンの分泌を誘導することを報告した(39)。2000 年になり、Hemmi らは CpG DNA の受容体分子として TLR9 を同定し(139)、これにより、ODN 研究は大きな幕開けを迎えた。以来、多種多様な生理活性へ影響を及ぼす ODN が報告され、感染症、アレルギー、がん、炎症性疾患（IBD や敗血症）および糖尿病など疾患モデル動物を用いた *in vivo* 試験により、その予防および治療効果が数多く検証されてきた(32, 45, 61, 140-142)。序論でも述べたように、ODN はまず免疫増強性と免疫抑制性に大別され、またそれぞれの ODN は 3 あるいは 4 つの Class に分類される。さらに Class の中には、異なる配列を有する ODN が無数に存在しており、実際の ODN の詳細な活性は Class だけでなく、それぞれの配列に依存している。このために、稀にアレルギーや敗血症などの疾患を悪化させてしまう ODN も幾つか報告がされている(14, 24, 45, 60)。将来的に、強力な予防および治療効果を有する ODN を安全に人類や家畜の健康に利用するためには、ODN による疾患の改善と悪化の両側面から研究し、基礎的知見を積み重ねることが重要である。そこで本研究では、ODN により改善あるいは悪化することが報告されているアレルギーあるいは敗血症を取り上げ、これら疾患と ODN との関連性について研究を行った。

近代医学の勃興とともに医学研究に実験的手法が用いられるようになった。当然のことながらヒト個体を実験の対象にできないという制約から、動物を用いた実験が行われるようになった(143)。疾患モデルでの研究は、1) ヒト疾患の病因解明とその結果を用いた診断法の開発と予防医学への応用、2) 生物の持つ高次機能の解明を期待できることから、今日の研究には欠かせないツールとなっている(143)。ヒト疾患の中でもアナフィラキシーなどの食物アレルギーは多くの研究者により研究が行われているが、未だ根治する作用機序は解明されていない。アナフィラキシーモデルを確立するためには、アジュバントと混ぜたアレルゲンを s.c.あるいは i.p.で繰り返し投与し、大量のアレルゲンを i.v.により投与することが必要である。しかしながら、i.v.および i.g.による手法は高度な手技を要する上、1 匹あたりの処理時間が長く、さらにモデル動物を確立するための期間を要するために動物実験を行う上で問題となっている。そこで本研究では、アレルギーの悪化に関与する IL-33 および IFN- γ を誘導し、AD モデルマウスにおいて AD を悪化した MsST をアジュバントに用いることで、2 回の i.p.により簡易的に誘導でき、かつ 2 週間という比較的短期間で誘導でき

るアナフィラキシーモデルマウスを作出した(84)。食物抗原として BW、OVA、CAS および BLG を用い、BW と MsST の組み合わせにより強力なアナフィラキシーショックを誘導することを明らかにした。次に BW と MsST の組み合わせにより誘導されるアナフィラキシーは、多くのアレルギーを悪化する IgE を抑制し、IgG_{2a} を増加した。さらに BW と MsST の組み合わせにより誘導されるアナフィラキシーは、IFN- γ 産生細胞数を有意に増加した。以上の研究成果から、MsST を用いた簡易的で強力なソバアナフィラキシーモデルを確立し、本モデルは IgE に非依存的であるという新たなメカニズムによりアナフィラキシーを発症することが示唆された。

敗血症は感染症への過剰な免疫応答であり、高い疾病率および死亡率を有する命を脅かす疾患である。敗血症では炎症応答および血液凝固が特徴的であり、その結果、重篤な臓器障害を引き起こし、最悪の場合死に至ることもある(100)。様々な因子が敗血症発症に関与する中で、PAF は炎症応答および血液凝固の両方の誘導に関わることから敗血症発症において中心的な役割を果たしていることが示唆されている(106-111)。この PAF を分解する酵素である PAF-AH は敗血症の治療標的分子として考えられている。そこで本研究は、CpG ODN と PAF-AH の関連性について検証し、2 種類の敗血症モデルを用いて敗血症に CpG ODN が有効であるかを検証した。結果として、Class A CpG ODN のみが強力に PAF-AH を誘導することを明らかにした。また敗血症の特徴である凝血症状に特化した DIC モデルにおいて、Class A CpG ODN が PAF-AH の活性化を介して生存率および凝血症状を改善することを明らかにした。さらに敗血症の起原菌となるグラム陰性菌の細胞壁構成成分である LPS により誘導するエンドトキシンショックモデルにおいて、Class A CpG ODN が PAF-AH の活性化を介して生存率および低体温症、続いて炎症症状を改善することを明らかにした。すなわち、Class A CpG ODN は PAF-AH の誘導および活性化を介して敗血症を改善することが明らかになった。

4-2 今後の課題と展望

本研究分野の究極的な目標は、ODN を疾患の予防・治療薬もしくは機能性食品として人類や動物に用いることである。実際、CpG ODN は抗原とともに用いることで感染症、がん、喘息および花粉症に対して使用可能な免疫治療薬として期待されており(33, 118)、臨床や家畜への応用は少しずつ現実味を帯びている。しかし、ODN を臨床および家畜へ応用するためには、本論文のように疾患を改善および悪化するという双方の基礎的知見の蓄積だけでなく、様々なアプローチからの研究をさらに展開する必要がある。そこで本論文では最後に、ODN 研究がより発展するために解決すべき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。

まず、ODN を臨床応用するためには、ヒトに見合った強力な効果を発揮することが必須である。現在、ODN 研究の多くは、マウスやラットなどの齧歯類を用いた実験が主となっている。臨床で用いる場合、体重の観点から ODN の投与量は、齧歯類と比べてはるかに多くなることが想定される。ODN 合成のコストは、合成技術の革新により年々下がっているものの臨床応用に必要な量を確保するためには未だ多くの課題が残っている。したがって、投与量に代わる観点から、この問題に向き合う必要がある。この問題に対し、Nigar らは *Lactobacillus rhamnosus* GG のゲノム配列に由来する ODN (iSN34) を CpG ODN と同時に用いた場合、CpG ODN により誘導される IL-6 産生を相乗的に増強することを明らかにしている(144)。また、Pohar らは CpG ODN の分解物を CpG ODN と同時に用いた場合、TLR9 活性を相乗的に増強することを明らかにしている。すなわち、これらの DNA 分子を CpG ODN とともに用いることで、ODN の投与量が抑えられることやさらに強力な効果が期待できる。

次に、ODN の投与方法に着目する。これまで多くの ODN 研究では、s.c.、i.p.、i.v. および鼻腔内投与 (i.n.) が主要であり、i.g. による知見はほとんど存在しない。Takahashi らはアレルギーモデルマウスに対して 1 mg の ODN を i.g. により投与している(67)が、前述したようにコストの観点から、ヒトへの応用を想定すると現実的でない。ODN は胃酸などの強酸や DNA 分解酵素に弱点を有している(45)。そのため、胃酸などの強酸に耐え、効率的かつ経口的な ODN 投与方法の開発が必要である。この問題に対して、Wang らは ODN をカルシウム性ナノ粒子により包摂することで、これらの弱点を克服する DNA ナノカプセル (DNanocap) の開発に成功し、ODN を効率的に腸管へと送達することに成功している(45)。腸管は、食品の消化および吸収に重要な器官であるだけでなく、体の半分以上の免疫細胞が存在する巨大なリンパ組織でもある(3)。腸管には、病原物質、ウイルスおよび微生物の侵入を防ぎ、粘膜の恒常性の維持において極めて重要な役割を担う粘膜免疫系が備わっている(145)。また腸管内には、数百億種類以上でおよそ 100 兆個にも及ぶ腸内細菌が生息している(146)。近年、腸内細菌は糖尿病、アレルギー、炎症性腸疾患 (IBD) などの疾患と密接に関係することが報告されている(147-149)。このために、腸管への ODN の送達は、新たに腸管の粘膜免疫系や腸内細菌叢を標的にでき、新たな ODN の機能の発見および一般的な経口薬のような使用法と食品素材としての価値を期待できる。

最後に、ODN の配列について述べる。ODN の臨床や家畜への応用のためには、ODN の安全性を確保することは重要である。これを実現するために、既知およびこれから新たに同定されるであろう ODN 配列を一度精査する必要がある。Pohar らはこれまでに報告されているヒトおよびマウス特異的 Class B CpG ODN の活性および配列を比較することで、それぞれの哺乳類 TLR9 の活性化において必要な Class B CpG ODN の最小配列を同定した(48, 49)。本論文の

研究のように、疾患を改善あるいは悪化する CpG ODN の効果は必ずしも分類される Class に依存するものではなく、配列特異的に機能しているものも挙げられる。このため、Pohar らが行った技術を応用し、疾患ごとに使用された ODN 配列を比較することで、これまでの Class とは異なる新たな分類を作成することが必要不可欠であると考え。本件については、今後の課題として是非着手したい。

4-3 総括

ODN-TLR9 機能の解明は、微生物学の発展だけでなく、疾患の制御を通して人類や家畜の健康に必ず貢献する。しかしながら、ODN は様々な配列に依存した生理活性を誘導し、また 1 種類の ODN が非常に多種多様な免疫応答に影響を及ぼすことから、その複雑さが未だ大きな課題である。そのため、ODN を臨床や家畜へ応用するために、ODN による疾患の改善と悪化の両側面から研究し、基礎的知見を積み重ねることが重要である。このような背景の中で、本研究ではこれまで一般的にアレルギーを改善する、あるいは敗血症を悪化することが報告されてきた ODN の新たな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. *Streptococcus thermophilus* ATCC19258 の *lac Z* 遺伝子に由来する MsST をアジュバントとして用いることで、簡易的かつ強力にアナフィラキシーを惹起するモデルマウスの作出に成功した。また、本モデルマウスは IgE に非依存的にアナフィラキシーを惹起することを示し、新たなアレルギー発症の作用機序を検証するツールとして提案した（第二章(84)）。
2. Class A CpG ODN が強力に PAF-AH を誘導することを発見した。また、Class A CpG ODN は PAF-AH の活性化を介して敗血症性ショックを軽減することを示し、敗血症の予防・軽減ツールとして提案した（第三章(100)）。

近年、“予防医学”という言葉が私たちの生活に浸透しつつある。これを具体的に実感する事象を挙げるとすると、ここ約 20 年で機能性食品や機能性表示食品が身の回りに急激に増加したことは誰もが納得することであろう。ODN はこの予防医学に大きく貢献する可能性を十分秘めているように思える。農学分野において研究に従事した者として、将来的に ODN を素材とした機能性食品が創製されることは非常に待ち遠しい。今後の研究において、ODN が人類や家畜の健康を向上するための身近なツールとなることを願っている。

参考文献

1. 今井 康之, 増澤 俊幸. *微生物学 : 病原微生物の基礎*. 改訂第 6 版 : 東京, 日本: 南江堂 (2011).
2. 本田 武司. *はじめの一步のイラスト感染症・微生物学 : はじめて学ぶ人のための目で見える教科書*: 東京, 日本: 羊土社 (2011).
3. 北澤 春樹, Villena J, Alaniz-Álvarez SA. *Probiotics : immunobiotics and immunogenics*: NY, USA, CRC Press (2011).
4. Hume ME. Historic perspective: prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. *Poult Sci* (2011) **90**(11):2663-9. doi: 10.3382/ps.2010-01030
5. Azizpour K, Bahrambeygi S, Mahmoodpour S, Azizpour A. History and Basic of Probiotics. *Res J Biol Sci* (2009) **4**:409-26.
6. Dubreuil JD. Enterotoxigenic *Escherichia coli* targeting intestinal epithelial tight junctions: An effective way to alter the barrier integrity. *Microb Pathog* (2017). doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.037
7. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* (2014) **5**:172. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172
8. Rancour DM, Backues SK, Bednarek SY. Protein antigen expression in *Escherichia coli* for antibody production. *Methods Mol Biol* (2010) **657**:3-20. doi: 10.1007/978-1-60761-783-9_1
9. Jia W, Li H, Zhao L, Nicholson JK. Gut microbiota: a potential new territory for drug targeting. *Nat Rev Drug Discov* (2008) **7**(2):123-9. doi: 10.1038/nrd2505
10. 落合 邦康. *腸内細菌・口腔細菌と全身疾患*: 東京, 日本: シーエムシー出版 (2015).
11. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* (2006) **124**(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015
12. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* (1996) **272**(5258):50-3.
13. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* (1997) **9**(1):4-9.
14. Starkhammar M, Larsson O, Kumlien Georen S, Leino M, Dahlen SE, Adner M, Cardell LO. Toll-like receptor ligands LPS and poly (I:C) exacerbate airway hyperresponsiveness in a model of airway allergy in mice, independently

- of inflammation. *PLoS One* (2014) **9**(8):e104114. doi: 10.1371/journal.pone.0104114
15. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* (2010) **11**(5):373-84. doi: 10.1038/ni.1863
 16. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* (2009) **9**(1):57-63. doi: 10.1038/nrc2541
 17. Franch R, Cardazzo B, Antonello J, Castagnaro M, Patarnello T, Bargelloni L. Full-length sequence and expression analysis of Toll-like receptor 9 in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Gene* (2006) **378**:42-51. doi: 10.1016/j.gene.2006.04.025
 18. Palti Y. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. *Dev Comp Immunol* (2011) **35**(12):1263-72. doi: 10.1016/j.dci.2011.03.006
 19. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* (2002) **20**:197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359
 20. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* (2007) **449**(7164):819-26. doi: 10.1038/nature06246
 21. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* (2009) **113**(7):1399-407. doi: 10.1182/blood-2008-07-019307
 22. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* (2009) **388**(4):621-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.062
 23. Kobayashi Y, Iwata A, Suzuki K, Suto A, Kawashima S, Saito Y, Owada T, Kobayashi M, Watanabe N, Nakajima H. B and T lymphocyte attenuator inhibits LPS-induced endotoxic shock by suppressing Toll-like receptor 4 signaling in innate immune cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) **110**(13):5121-6. doi: 10.1073/pnas.1222093110
 24. Shirota H, Gursel I, Gursel M, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides protect mice from lethal endotoxic shock. *J Immunol* (2005) **174**(8):4579-83.
 25. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* (2004) **5**(2):190-8. doi: 10.1038/ni1028
 26. Nakagawa R, Yoshida H, Asakawa M, Tamiya T, Inoue N, Morita R,

- Inoue H, Nakao A, Yoshimura A. Pyridone 6, a pan-JAK inhibitor, ameliorates allergic skin inflammation of NC/Nga mice via suppression of Th2 and enhancement of Th17. *J Immunol* (2011) **187**(9):4611-20. doi: 10.4049/jimmunol.1100649
27. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* (1998) **28**(6):2045-54. doi: 10.1002/(sici)1521-4141(199806)28:06<2045::aid-immu2045>3.0.co;2-8
 28. Hussain I, Kline JN. CpG oligodeoxynucleotides: a novel therapeutic approach for atopic disorders. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* (2003) **2**(3):199-205.
 29. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* (2002) **20**:709-60. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
 30. Storni T, Ruedl C, Schwarz K, Schwendener RA, Renner WA, Bachmann MF. Nonmethylated CG motifs packaged into virus-like particles induce protective cytotoxic T cell responses in the absence of systemic side effects. *J Immunol* (2004) **172**(3):1777-85.
 31. Vollmer J, Krieg AM. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv Drug Deliv Rev* (2009) **61**(3):195-204. doi: 10.1016/j.addr.2008.12.008
 32. Kulis M, Gorentla B, Burks AW, Zhong XP. Type B CpG oligodeoxynucleotides induce Th1 responses to peanut antigens: modulation of sensitization and utility in a truncated immunotherapy regimen in mice. *Mol Nutr Food Res* (2013) **57**(5):906-15. doi: 10.1002/mnfr.201200410
 33. Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* (2004) **4**(4):249-58. doi: 10.1038/nri1329
 34. Trieu A, Roberts TL, Dunn JA, Sweet MJ, Stacey KJ. DNA motifs suppressing TLR9 responses. *Crit Rev Immunol* (2006) **26**(6):527-44.
 35. Yamada H, Gursel I, Takeshita F, Conover J, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita S, Klinman DM. Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation. *J Immunol* (2002) **169**(10):5590-4.
 36. Zeuner RA, Ishii KJ, Lizak MJ, Gursel I, Yamada H, Klinman DM, Verthelyi D. Reduction of CpG-induced arthritis by suppressive

- oligodeoxynucleotides. *Arthritis Rheum* (2002) **46**(8):2219-24. doi: 10.1002/art.10423
37. Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol* (2003) **171**(3):1393-400.
 38. Ito Y, Shigemori S, Sato T, Shimazu T, Hatano K, Otani H, Kitazawa H, Shimosato T. Class I/II hybrid inhibitory oligodeoxynucleotide exerts Th1 and Th2 double immunosuppression. *FEBS Open Bio* (2013) **3**:41-5. doi: 10.1016/j.fob.2012.11.002
 39. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* (1995) **374**(6522):546-9. doi: 10.1038/374546a0
 40. Shiota H, Gursel M, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit Th1 differentiation by blocking IFN-gamma- and IL-12-mediated signaling. *J Immunol* (2004) **173**(8):5002-7.
 41. Fujimoto C, Klinman DM, Shi G, Yin H, Vistica BP, Lovaas JD, Wawrousek EF, Igarashi T, Chan CC, Gery I. A suppressive oligodeoxynucleotide inhibits ocular inflammation. *Clin Exp Immunol* (2009) **156**(3):528-34. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03918.x
 42. Ikeuchi H, Kinjo T, Klinman DM. Effect of suppressive oligodeoxynucleotides on the development of inflammation-induced papillomas. *Cancer Prev Res (Phila)* (2011) **4**(5):752-7. doi: 10.1158/1940-6207.capr-10-0290
 43. Sato T, Shimosato T, Alvord WG, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit silica-induced pulmonary inflammation. *J Immunol* (2008) **180**(11):7648-54.
 44. Wang YZ, Liang QH, Ramkalawan H, Zhang W, Zhou WB, Xiao B, Tian FF, Yang H, Li J, Zhang Y, Xu NA. Inactivation of TLR9 by a suppressive oligodeoxynucleotides can ameliorate the clinical signs of EAN. *Immunol Invest* (2012) **41**(2):171-82. doi: 10.3109/08820139.2011.604864
 45. 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

46. Shimosato T, Tohno M, Kitazawa H, Katoh S, Watanabe K, Kawai Y, Aso H, Yamaguchi T, Saito T. Toll-like receptor 9 is expressed on follicle-associated epithelia containing M cells in swine Peyer's patches. *Immunol Lett* (2005) **98**(1):83-9. doi: 10.1016/j.imlet.2004.10.026
47. Shimosato T, Kimura T, Tohno M, Iliev ID, Katoh S, Ito Y, Kawai Y, Sasaki T, Saito T, Kitazawa H. Strong immunostimulatory activity of AT-oligodeoxynucleotide requires a six-base loop with a self-stabilized 5'-C...G-3' stem structure. *Cell Microbiol* (2006) **8**(3):485-95. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00640.x
48. Pohar J, Kuznik Krajnik A, Jerala R, Bencina M. Minimal sequence requirements for oligodeoxyribonucleotides activating human TLR9. *J Immunol* (2015) **194**(8):3901-8. doi: 10.4049/jimmunol.1402755
49. Pohar J, Lainscek D, Fukui R, Yamamoto C, Miyake K, Jerala R, Bencina M. Species-Specific Minimal Sequence Motif for Oligodeoxyribonucleotides Activating Mouse TLR9. *J Immunol* (2015) **195**(9):4396-405. doi: 10.4049/jimmunol.1500600
50. Pohar J, Lainscek D, Ivicak-Kocjan K, Cajnko MM, Jerala R, Bencina M. Short single-stranded DNA degradation products augment the activation of Toll-like receptor 9. *Nat Commun* (2017) **8**:15363. doi: 10.1038/ncomms15363
51. Chan MP, Onji M, Fukui R, Kawane K, Shibata T, Saitoh S, Ohto U, Shimizu T, Barber GN, Miyake K. DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nat Commun* (2015) **6**:5853. doi: 10.1038/ncomms6853
52. Kline JN, Krieg AM. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect* (2008) **21**(8):434-9. doi: 10.1358/dnp.2008.21.8.1272133
53. Tel J, Beenhakker N, Koopman G, Hart B, Mudde GC, de Vries IJ. Targeted delivery of CpG ODN to CD32 on human and monkey plasmacytoid dendritic cells augments IFNalpha secretion. *Immunobiology* (2012) **217**(10):1017-24. doi: 10.1016/j.imbio.2012.01.016
54. Ramaprakash H, Hogaboam CM. Intranasal CpG therapy attenuated experimental fungal asthma in a TLR9-dependent and -independent manner. *Int Arch Allergy Immunol* (2010) **152**(2):98-112. doi: 10.1159/000265531
55. Ramaprakash H, Shibata T, Duffy KE, Ismailoglu UB, Bredernitz RM, Moreira AP, Coelho AL, Das AM, Fursov N, Chupp GL, Hogaboam CM.

- Targeting ST2L potentiates CpG-mediated therapeutic effects in a chronic fungal asthma model. *Am J Pathol* (2011) **179**(1):104-15. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.032
56. Shimosato T, Tohno M, Sato T, Nishimura J, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H. Identification of a potent immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus* lacZ. *Anim Sci J* (2009) **80**(5):597-604. doi: 10.1111/j.1740-0929.2009.00680.x
57. Shimosato T, Fujimoto M, Tohno M, Sato T, Tateo M, Otani H, Kitazawa H. CpG oligodeoxynucleotides induce strong up-regulation of interleukin 33 via Toll-like receptor 9. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) **394**(1):81-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.110
58. Khodoun MV, Tomar S, Tocker JE, Wang YH, Finkelman FD. Prevention of food allergy development and suppression of established food allergy by neutralization of thymic stromal lymphopoietin, IL-25, and IL-33. *J Allergy Clin Immunol* (2017). doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.046
59. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, von Mutius E, Farrall M, Lathrop M, Cookson W. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. *N Engl J Med* (2010) **363**(13):1211-21. doi: 10.1056/NEJMoa0906312
60. Takakura M, Takeshita F, Aihara M, Xin KQ, Ichino M, Okuda K, Ikezawa Z. Hyperproduction of IFN-gamma by CpG oligodeoxynucleotide-induced exacerbation of atopic dermatitis-like skin lesion in some NC/Nga mice. *J Invest Dermatol* (2005) **125**(6):1156-62. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23928.x
61. Tripathi D, Venkatasubramanian S, Cheekatla SS, Paidipally P, Welch E, Tvinnereim AR, Vankayalapati R. A TLR9 agonist promotes IL-22-dependent pancreatic islet allograft survival in type 1 diabetic mice. *Nat Commun* (2016) **7**:13896. doi: 10.1038/ncomms13896
62. Hong CP, Yun CH, Lee GW, Park A, Kim YM, Jang MH. TLR9 regulates adipose tissue inflammation and obesity-related metabolic disorders. *Obesity (Silver Spring)* (2015) **23**(11):2199-206. doi: 10.1002/oby.21215
63. Kitazawa H, Watanabe H, Shimosato T, Kawai Y, Itoh T, Saito T. Immunostimulatory oligonucleotide, CpG-like motif exists in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NIAI B6. *Int J Food Microbiol* (2003) **85**(1-2):11-21.
64. Iliev ID, Tohno M, Kurosaki D, Shimosato T, He F, Hosoda M, Saito

- T, Kitazawa H. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTTCGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice. *Scand J Immunol* (2008) **67**(4):370-6. doi: 10.1111/j.1365-3083.2008.02080.x
65. Iliev ID, Kitazawa H, Shimosato T, Katoh S, Morita H, He F, Hosoda M, Saito T. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell Microbiol* (2005) **7**(3):403-14. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00470.x
66. Takahashi N, Kitazawa H, Iwabuchi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K, Saito T. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune responses in a murine model. *Clin Exp Immunol* (2006) **145**(1):130-8. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03111.x
67. Takahashi N, Kitazawa H, Iwabuchi N, Xiao JZ, Miyaji K, Iwatsuki K, Saito T. Oral administration of an immunostimulatory DNA sequence from *Bifidobacterium longum* improves Th1/Th2 balance in a murine model. *Biosci Biotechnol Biochem* (2006) **70**(8):2013-7.
68. Takahashi N, Kitazawa H, Shimosato T, Iwabuchi N, Xiao JZ, Iwatsuki K, Kokubo S, Saito T. An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of *Bifidobacterium longum* inhibits IgE production in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2006) **46**(3):461-9. doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00064.x
69. Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, Saito T, Itoh T, Yamaguchi T. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *Int J Food Microbiol* (2001) **65**(3):149-62.
70. Shimosato T, Kitazawa H, Katoh S, Tohno M, Iliev ID, Nagasawa C, Kimura T, Kawai Y, Saito T. Augmentation of T(H)-1 type response by immunoactive AT oligonucleotide from lactic acid bacteria via Toll-like receptor 9 signaling. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **326**(4):782-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.119
71. Chafen JJ, Newberry SJ, Riedl MA, Bravata DM, Maglione M, Suttorp MJ, Sundaram V, Paige NM, Towfigh A, Hulley BJ, Shekelle PG. Diagnosing and managing common food allergies: a systematic review. *Jama* (2010) **303**(18):1848-56. doi: 10.1001/jama.2010.582
72. Chu DK, Mohammed-Ali Z, Jimenez-Saiz R, Walker TD, Goncharova

- S, Llop-Guevara A, Kong J, Gordon ME, Barra NG, Gillgrass AE, Van Seggelen H, Khan WI, Ashkar AA, Bramson JL, Humbles AA, Kolbeck R, Wasserman S, Jordana M. T helper cell IL-4 drives intestinal Th2 priming to oral peanut antigen, under the control of OX40L and independent of innate-like lymphocytes. *Mucosal Immunol* (2014) **7**(6):1395-404. doi: 10.1038/mi.2014.29
73. Sicherer SH, Leung DY. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2013. *J Allergy Clin Immunol* (2014) **133**(2):324-34. doi: 10.1016/j.jaci.2013.11.013
74. Simon D, Lindberg RL, Kozlowski E, Braathen LR, Simon HU. Epidermal caspase-3 cleavage associated with interferon-gamma-expressing lymphocytes in acute atopic dermatitis lesions. *Exp Dermatol* (2006) **15**(6):441-6. doi: 10.1111/j.0906-6705.2006.00428.x
75. Komai-Koma M, Brombacher F, Pushparaj PN, Arendse B, McSharry C, Alexander J, Chaudhuri R, Thomson NC, McKenzie AN, McInnes I, Liew FY, Xu D. Interleukin-33 amplifies IgE synthesis and triggers mast cell degranulation via interleukin-4 in naive mice. *Allergy* (2012) **67**(9):1118-26. doi: 10.1111/j.1398-9995.2012.02859.x
76. Nakae S, Morita H, Ohno T, Arae K, Matsumoto K, Saito H. Role of interleukin-33 in innate-type immune cells in allergy. *Allergol Int* (2013) **62**(1):13-20. doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0538
77. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* (2005) **23**(5):479-90. doi: 10.1016/j.immuni.2005.09.015
78. Bi J, Zeng X, Zhao L, Wei Q, Yu L, Wang X, Yu Z, Cao Y, Shan F, Wei M. miR-181a Induces Macrophage Polarized to M2 Phenotype and Promotes M2 Macrophage-mediated Tumor Cell Metastasis by Targeting KLF6 and C/EBPalpha. *Mol Ther Nucleic Acids* (2016) **5**:e368. doi: 10.1038/mtna.2016.71
79. Batista NV, Pereira RV, Noviello ML, Dourado LP, Perez DA, Foureaux G, Ferreira AJ, Ferreira AV, Cara DC. Prolonged ingestion of ovalbumin diet by sensitized mice improves the metabolic consequences induced by experimental food allergy. *Clin Exp Immunol* (2014) **178**(3):416-27. doi: 10.1111/cei.12435

80. Tordesillas L, Goswami R, Benede S, Grishina G, Dunkin D, Jarvinen KM, Maleki SJ, Sampson HA, Berin MC. Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. *J Clin Invest* (2014) **124**(11):4965-75. doi: 10.1172/jci75660
81. Tsukamoto K, Yamamoto K, Makino T. Counteractive effect of *Paeonia lactiflora* root constituent mudanpioside E against suppressive effect of Shoseiryuto-extract on passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *J Ethnopharmacol* (2014) **153**(3):884-9. doi: 10.1016/j.jep.2014.03.053
82. Nakagawa Y, Gallo RL. Endogenous intracellular cathelicidin enhances TLR9 activation in dendritic cells and macrophages. *J Immunol* (2015) **194**(3):1274-84. doi: 10.4049/jimmunol.1402388
83. Ciabattini A, Pettini E, Fiorino F, Pastore G, Andersen P, Pozzi G, Medaglini D. Modulation of Primary Immune Response by Different Vaccine Adjuvants. *Front Immunol* (2016) **7**:427. doi: 10.3389/fimmu.2016.00427
84. Yamamoto Y, Shigemori S, Nigar S, Oshiro K, Wang Y, Sato T, Shimosato T. Development of a simple IgE-independent anaphylactic model using buckwheat antigen and B-type CpG oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus*. *Anim Sci J* (2016) **87**(5):710-7. doi: 10.1111/asj.12479
85. 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
86. Shigemori S, Yonekura S, Sato T, Nakanishi M, Otani H, Shimosato T. Expression of a biologically active GFP-alpha(S1)-casein fusion protein in *Lactococcus lactis*. *Curr Microbiol* (2012) **64**(6):569-75. doi: 10.1007/s00284-012-0111-x
87. Shigemori S, Oshiro K, Wang P, Yamamoto Y, Wang Y, Sato T, Uyeno Y, Shimosato T. Generation of dipeptidyl peptidase-IV-inhibiting peptides from beta-lactoglobulin secreted by *Lactococcus lactis*. *Biomed Res Int* (2014) **2014**:393598. doi: 10.1155/2014/393598
88. Kojima T, Obata K, Mukai K, Sato S, Takai T, Minegishi Y, Karasuyama H. Mast cells and basophils are selectively activated in vitro and in vivo through CD200R3 in an IgE-independent manner. *J Immunol* (2007) **179**(10):7093-100.

89. Khan BQ, Kemp SF. Pathophysiology of anaphylaxis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* (2011) **11**(4):319-25. doi: 10.1097/ACI.0b013e3283481ab6
90. Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* (2012) **18**(5):673-83. doi: 10.1038/nm.2731
91. Bousquet J, van Cauwenberge P, Ait Khaled N, Bachert C, Baena-Cagnani CE, Bouchard J, Bunnag C, Canonica GW, Carlsen KH, Chen YZ, Cruz AA, Custovic A, Demoly P, Dubakiene R, Durham S, Fokkens W, Howarth P, Kemp J, Kowalski ML, Kvedariene V, Lipworth B, Lockey R, Lund V, Mavale-Manuel S, Meltzer EO, Mullol J, Naclerio R, Nekam K, Ohta K, Papadopoulos N, Passalacqua G, Pawankar R, Popov T, Potter P, Price D, Scadding G, Simons FE, Spicak V, Valovirta E, Wang DY, Yawn B, Yusuf O. Pharmacologic and anti-IgE treatment of allergic rhinitis ARIA update (in collaboration with GA2LEN). *Allergy* (2006) **61**(9):1086-96. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01144.x
92. Lakshmi BS, Wang R, Madhubala R. Leishmania genome analysis and high-throughput immunological screening identifies tuzin as a novel vaccine candidate against visceral leishmaniasis. *Vaccine* (2014) **32**(30):3816-22. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.04.088
93. Chung F. Anti-inflammatory cytokines in asthma and allergy: interleukin-10, interleukin-12, interferon-gamma. *Mediators Inflamm* (2001) **10**(2):51-9. doi: 10.1080/09629350120054518
94. Fang H, Aosai F, Mun HS, Norose K, Ahmed AK, Furuya M, Yano A. Anaphylactic reaction induced by Toxoplasma gondii-derived heat shock protein 70. *Int Immunol* (2006) **18**(10):1487-97. doi: 10.1093/intimm/dxl081
95. Kikumura A, Fang H, Mun HS, Uemura N, Makino M, Sayama Y, Norose K, Aosai F. Protective immunity against lethal anaphylactic reaction in Toxoplasma gondii-infected mice by DNA vaccination with T. gondii-derived heat shock protein 70 gene. *Parasitol Int* (2010) **59**(2):105-11. doi: 10.1016/j.parint.2010.03.006
96. Cozzi E, Ackerman KG, Lundquist A, Drazen JM, Boyce JA, Beier DR. The naive airway hyperresponsiveness of the A/J mouse is Kit-mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011) **108**(31):12787-92. doi: 10.1073/pnas.1106582108
97. Dudeck A, Dudeck J, Scholten J, Petzold A, Surianarayanan S, Kohler A, Peschke K, Vohringer D, Waskow C, Krieg T, Muller W, Waisman A,

Hartmann K, Gunzer M, Roers A. Mast cells are key promoters of contact allergy that mediate the adjuvant effects of haptens. *Immunity* (2011) **34**(6):973-84.

doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.028

98. Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y, Watanabe N, Karasuyama H. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood* (2007) **110**(3):913-20. doi: 10.1182/blood-2007-01-068718

99. Reber LL, Marichal T, Mukai K, Kita Y, Tokuoka SM, Roers A, Hartmann K, Karasuyama H, Nadeau KC, Tsai M, Galli SJ. Selective ablation of mast cells or basophils reduces peanut-induced anaphylaxis in mice. *J Allergy Clin Immunol* (2013) **132**(4):881-8.e1-11. doi: 10.1016/j.jaci.2013.06.008

100. Yamamoto Y, Sugimura R, Watanabe T, Shigemori S, Okajima T, Nigar S, Namai F, Sato T, Ogita T, Shimosato T. Class A CpG Oligonucleotide Priming Rescues Mice from Septic Shock via Activation of Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase. *Front Immunol* (2017) **8**:1049. doi: 10.3389/fimmu.2017.01049

101. Opal SM, Laterre PF, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira JP, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, Jauregui L, Krell K, Pacht J, Takahashi T, Peckelsen C, Cordasco E, Chang CS, Oeyen S, Aikawa N, Maruyama T, Schein R, Kalil AC, Van Nuffelen M, Lynn M, Rossignol DP, Gogate J, Roberts MB, Wheeler JL, Vincent JL. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *Jama* (2013) **309**(11):1154-62. doi: 10.1001/jama.2013.2194

102. Rice TW, Wheeler AP, Bernard GR, Vincent JL, Angus DC, Aikawa N, Demeyer I, Sainati S, Amlot N, Cao C, Ii M, Matsuda H, Mouri K, Cohen J. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of TAK-242 for the treatment of severe sepsis. *Crit Care Med* (2010) **38**(8):1685-94. doi: 10.1097/CCM.0b013e3181e7c5c9

103. Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, Kawata T, Kimura A, Kobayashi S, Przetak M, Chow J, Gusovsky F, Christ WJ, Rossignol DP. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* (2003) **304**(3):1093-102. doi: 10.1124/jpet.102.044487

104. Takashima K, Matsunaga N, Yoshimatsu M, Hazeki K, Kaisho T, Uekata M, Hazeki O, Akira S, Iizawa Y, Ii M. Analysis of binding site for the

- novel small-molecule TLR4 signal transduction inhibitor TAK-242 and its therapeutic effect on mouse sepsis model. *Br J Pharmacol* (2009) **157**(7):1250-62. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00297.x
105. Park SH, Baek SI, Yun J, Lee S, Yoon DY, Jung JK, Jung SH, Hwang BY, Hong JT, Han SB, Kim Y. IRAK4 as a molecular target in the amelioration of innate immunity-related endotoxic shock and acute liver injury by chlorogenic acid. *J Immunol* (2015) **194**(3):1122-30. doi: 10.4049/jimmunol.1402101
 106. Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res* (1993) **34**(5):691-702.
 107. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* (1972) **136**(6):1356-77.
 108. Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P. Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* (2015) **135**(6):1424-32. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.019
 109. Balsa D, Merlos M, Giral M, Ferrando R, Garcia-Rafanell J, Forn J. Effects of a new platelet-activating factor antagonist, UR-12670, on several endotoxic shock markers in rats. *Drugs Exp Clin Res* (1997) **23**(5-6):191-9.
 110. Dubois C, Bissonnette E, Rola-Pleszczynski M. Platelet-activating factor (PAF) enhances tumor necrosis factor production by alveolar macrophages. Prevention by PAF receptor antagonists and lipoxygenase inhibitors. *J Immunol* (1989) **143**(3):964-70.
 111. Valone FH, Philip R, Debs RJ. Enhanced human monocyte cytotoxicity by platelet-activating factor. *Immunology* (1988) **64**(4):715-8.
 112. Jacob SP, Lakshmikanth CL, Chaithra VH, Kumari TR, Chen CH, McIntyre TM, Marathe GK. Lipopolysaccharide Cross-Tolerance Delays Platelet-Activating Factor-Induced Sudden Death in Swiss Albino Mice: Involvement of Cyclooxygenase in Cross-Tolerance. *PLoS One* (2016) **11**(4):e0153282. doi: 10.1371/journal.pone.0153282
 113. Teixeira-da-Cunha MG, Gomes RN, Roehrs N, Bozza FA, Prescott SM, Stafforini D, Zimmerman GA, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC. Bacterial clearance is improved in septic mice by platelet-activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH) administration. *PLoS One* (2013) **8**(9):e74567. doi: 10.1371/journal.pone.0074567

114. Schuster DP, Metzler M, Opal S, Lowry S, Balk R, Abraham E, Levy H, Slotman G, Coyne E, Souza S, Pribble J. Recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase to prevent acute respiratory distress syndrome and mortality in severe sepsis: Phase IIb, multicenter, randomized, placebo-controlled, clinical trial. *Crit Care Med* (2003) **31**(6):1612-9. doi: 10.1097/01.ccm.0000063267.79824.db
115. Rice L, Orlow D, Ceonzo K, Stahl GL, Tzianabos AO, Wada H, Aird WC, Buras JA. CpG oligodeoxynucleotide protection in polymicrobial sepsis is dependent on interleukin-17. *J Infect Dis* (2005) **191**(8):1368-76. doi: 10.1086/428452
116. Gao M, Ha T, Zhang X, Wang X, Liu L, Kalbfleisch J, Singh K, Williams D, Li C. The Toll-like receptor 9 ligand, CpG oligodeoxynucleotide, attenuates cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis, involving activation of both phosphoinositide 3 kinase/Akt and extracellular-signal-related kinase signaling. *J Infect Dis* (2013) **207**(9):1471-9. doi: 10.1093/infdis/jit036
117. Wu H, Yang J, Su EM, Li L, Zhao C, Yang X, Gao Z, Pan M, Sun P, Sun W, Jiang Y, Su X. Lipoxin A4 and platelet activating factor are involved in E. coli or LPS-induced lung inflammation in CFTR-deficient mice. *PLoS One* (2014) **9**(3):e93003. doi: 10.1371/journal.pone.0093003
118. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* (2006) **5**(6):471-84. doi: 10.1038/nrd2059
119. Berthelsen LO, Kristensen AT, Tranholm M. Animal models of DIC and their relevance to human DIC: a systematic review. *Thromb Res* (2011) **128**(2):103-16. doi: 10.1016/j.thromres.2010.12.002
120. Chen J, Yang L, Foulks JM, Weyrich AS, Marathe GK, McIntyre TM. Intracellular PAF catabolism by PAF acetylhydrolase counteracts continual PAF synthesis. *J Lipid Res* (2007) **48**(11):2365-76. doi: 10.1194/jlr.M700325-JLR200
121. Kell PJ, Creer MH, Crown KN, Wirsig K, McHowat J. Inhibition of platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase by methyl arachidonyl fluorophosphonate potentiates PAF synthesis in thrombin-stimulated human coronary artery endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* (2003) **307**(3):1163-70. doi: 10.1124/jpet.103.055392
122. Engelberts I, von Asmuth EJ, van der Linden CJ, Buurman WA. The interrelation between TNF, IL-6, and PAF secretion induced by LPS in an in

- vivo and in vitro murine model. *Lymphokine Cytokine Res* (1991) **10**(1-2):127-31.
123. Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol* (2000) **165**(8):4537-43.
124. Bulger EM, Arbabi S, Garcia I, Maier RV. The macrophage response to endotoxin requires platelet activating factor. *Shock* (2002) **17**(3):173-9.
125. Gomes RN, Bozza FA, Amancio RT, Japiassu AM, Vianna RC, Larangeira AP, Gouvea JM, Bastos MS, Zimmerman GA, Stafforini DM, Prescott SM, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC. Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock* (2006) **26**(1):41-9. doi: 10.1097/01.shk.0000209562.00070.1a
126. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* (2016) **315**(8):801-10. doi: 10.1001/jama.2016.0287
127. Bick RL. Disseminated intravascular coagulation: a review of etiology, pathophysiology, diagnosis, and management: guidelines for care. *Clin Appl Thromb Hemost* (2002) **8**(1):1-31.
128. Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Star RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J Clin Invest* (2009) **119**(10):2868-78. doi: 10.1172/jci39421
129. Lakshmikanth CL, Jacob SP, Kudva AK, Latchoumycandane C, Yashaswini PS, Sumanth MS, Goncalves-de-Albuquerque CF, Silva AR, Singh SA, Castro-Faria-Neto HC, Prabhu SK, McIntyre TM, Marathe GK. Escherichia coli Braun Lipoprotein (BLP) exhibits endotoxemia - like pathology in Swiss albino mice. *Sci Rep* (2016) **6**:34666. doi: 10.1038/srep34666
130. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* (2003) **9**(5):517-24. doi: 10.1038/nm0503-517
131. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin.

Science (1985) **229**(4716):869-71.

132. Gomes RN, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Soares MB, Shoemaker CB, David JR, Bozza MT. Calcitonin gene-related peptide inhibits local acute inflammation and protects mice against lethal endotoxemia. *Shock* (2005) **24**(6):590-4.

133. Bozza M, Soares MB, Bozza PT, Satoskar AR, Diacovo TG, Brombacher F, Titus RG, Shoemaker CB, David JR. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur J Immunol* (1998) **28**(10):3120-7. doi: 10.1002/(sici)1521-4141(199810)28:10<3120::aid-immu3120>3.0.co;2-3

134. Elstad MR, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. *J Biol Chem* (1989) **264**(15):8467-70.

135. Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* (1990) **265**(17):9682-7.

136. De Nardo D, De Nardo CM, Nguyen T, Hamilton JA, Scholz GM. Signaling crosstalk during sequential TLR4 and TLR9 activation amplifies the inflammatory response of mouse macrophages. *J Immunol* (2009) **183**(12):8110-8. doi: 10.4049/jimmunol.0901031

137. Julian MW, Strange HR, Ballinger MN, Hotchkiss RS, Papenfuss TL, Crouser ED. Tolerance and Cross-Tolerance following Toll-Like Receptor (TLR)-4 and -9 Activation Are Mediated by IRAK-M and Modulated by IL-7 in Murine Splenocytes. *PLoS One* (2015) **10**(7):e0132921. doi: 10.1371/journal.pone.0132921

138. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* (1984) **72**(4):955-62.

139. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* (2000) **408**(6813):740-5. doi:

10.1038/35047123

140. Alipour S, Mahdavi A, Abdoli A. The effects of CpG-ODNs and Chitosan adjuvants on the elicitation of immune responses induced by the HIV-1-Tat-based candidate vaccines in mice. *Pathog Dis* (2017) **75**(2). doi: 10.1093/femspd/ftx013
141. Takahashi R, Sato T, Klinman DM, Shimosato T, Kaneko T, Ishigatsubo Y. Suppressive oligodeoxynucleotides synergistically enhance antiproliferative effects of anticancer drugs in A549 human lung cancer cells. *Int J Oncol* (2013) **42**(2):429-36. doi: 10.3892/ijo.2012.1755
142. Bleich A, Janus LM, Smoczek A, Westendorf AM, Strauch U, Mahler M, Hedrich HJ, Fichtner-Feigl S, Scholmerich J, Falk W, Hofmann C, Obermeier F. CpG motifs of bacterial DNA exert protective effects in mouse models of IBD by antigen-independent tolerance induction. *Gastroenterology* (2009) **136**(1):278-87. doi: 10.1053/j.gastro.2008.09.022
143. 森脇 和郎, 山村 研一, 米川 博通. モデル動物の作製と維持: 東京, 日本: エル・アイ・シー (2004).
144. Nigar S, Yamamoto Y, Okajima T, Shigemori S, Sato T, Ogita T, Shimosato T. Synergistic oligodeoxynucleotide strongly promotes CpG-induced interleukin-6 production. *BMC Immunol* (2017) **18**(1):44. doi: 10.1186/s12865-017-0227-7
145. 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).
146. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* (2010) **464**(7285):59-65. doi: 10.1038/nature08821
147. Sohail MU, Althani A, Anwar H, Rizzi R, Marei HE. Role of the Gastrointestinal Tract Microbiome in the Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* (2017) **2017**:9631435. doi: 10.1155/2017/9631435
148. Aitoro R, Paparo L, Amoroso A, Di Costanzo M, Cosenza L, Granata

V, Di Scala C, Nocerino R, Trinchese G, Montella M, Ercolini D, Berni Canani R. Gut Microbiota as a Target for Preventive and Therapeutic Intervention against Food Allergy. *Nutrients* (2017) **9**(7). doi: 10.3390/nu9070672

149. Ananthakrishnan AN, Bernstein CN, Iliopoulos D, Macpherson A, Neurath MF, Ali RAR, Vavricka SR, Fiocchi C. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2017). doi: 10.1038/nrgastro.2017.136

謝辞

本論文は筆者が信州大学大学院総合工学系研究科生物・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。本研究において、また本論文をまとめるにあたり終始懇切丁寧なる御指導を賜りました信州大学学術研究院（農学系）下里 剛士 准教授に心より感謝申し上げます。また、審査委員として本論文を御精査戴き、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）濱野 光市 教授、信州大学学術研究院（農学系）真壁 秀文 教授、信州大学学術研究院（農学系）米倉 真一 准教授ならびに東北大学大学院農学研究科附属食と農免疫国際教育研究センター 北澤 春樹 副センター長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戴き、御指導、御助力を戴きました信州大学農学部農学生命科学科動物資源生命科学コース 渡邊 敬文 助教に深謝申し上げます。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、御指導を戴きました横浜市立大学医学部医学科呼吸器病学 佐藤 隆 講師に深謝申し上げます。研究室に新たな技術、知識を御教授戴き、日頃から多大なる御協力を戴きました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 助教に深く感謝申し上げます。研究室配属当初から研究、生活および精神面などサポートして戴き、いつ何時もリードし、研究者としての在り方を御教授戴きました筑波大学医学医療系/トランスボーダー医学研究センターメタボロミクス分野 重盛 駿 助教に深く感謝申し上げます。終わりにあたり、同じ研究室で研究活動を共にし、幾多の討論を交わし、そして非常に豊かな学生生活を創造して戴きました Shireen Nigar さん、岡島 拓真 君、杉村 隆 君、生井 楓 君、山田 瑞希 さんをはじめとして、お世話になりました研究室の皆様心より感謝申し上げます。

最後に、長期に亘り温かく見守り、いつも陰ながら支えてくれた両親をはじめとする家族に感謝申し上げます。

本研究の一部は日本学術振興会科研費（No. 16J02224）の助成を受けて行われたものです。

平成 30 年 1 月 9 日 山本 祥也

公表論文

1. Yamamoto Y, Shigemori S, Nigar S, Oshiro K, Wang Y, Sato T, Shimosato T: Development of a simple IgE-independent anaphylactic model using buckwheat antigen and B-type CpG oligodeoxynucleotide from *Streptococcus thermophilus*. *Animal Science Journal*, 87, 5: 710-717, 2016.
2. Yamamoto Y, Sugimura R, Watanabe T, Shigemori S, Okajima T, Nigar S, Namai F, Sato T, Ogita T, Shimosato T: Class A CpG oligodeoxynucleotide priming rescues mice from septic shock via activation of platelet-activating factor acetylhydrolase. *Frontiers in Immunology*, 8: 1049, 2017.