

氏名	山本 祥也
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	甲 第 77 号
学位授与の日付	平成30年3月20日
学位授与の要件	信州大学学位規程第5条第1項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	主査 准教授 下里 剛士 教授 濱野 光市 教授 真壁 秀文 准教授 米倉 真一 准教授 北澤 春樹 (東北大学)

論 文 内 容 の 要 旨

オリゴ核酸 (oligodeoxynucleotide, ODN) は多彩で強力な免疫機能性を有する短い1本鎖核酸分子である。ODNには、免疫増強型の CpG ODN と免疫抑制型の inhibitory ODN (iODN) が存在する。これまでに ODN は、感染症やアレルギー、がん、炎症性疾患、自己免疫疾患など様々な疾患を対象として予防・治療などの研究が行われてきた。ODN の活性は配列に依存することから、疾患を改善あるいは悪化する両側面が報告されている。しかしながら、ODN をヒトや家畜を対象として用いる場合、疾患を改善あるいは悪化する両側面の知見をさらに蓄積し、多角的に考察することが重要である。そこで本研究では、アレルギーを悪化させる CpG ODN と敗血症を改善する CpG ODN の研究に取り組み、疾患モデルの確立や疾患の予防・軽減に向けた ODN の有用性を検討した。

1. 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

アナフィラキシーショックは、過去に曝露された抗原タンパク質 (アレルゲン) に対して生じる極めて重度な免疫反応である。これまでに欧米の研究グループを中心に、卵白アルブミン (OVA) やピーナッツをアレルゲンとしたアナフィラキシーショックモデルマウスが作出されている。実験モデルとしてのアナフィラキシーショックの誘導では、皮下 (s.c.) および腹腔内 (i.p.) へと少量のアレルゲンをアジュバントとともに複数回繰り返し感作を行い、免疫を成立させた上で、大量のアレルゲンを尾静脈より投与 (i.v.) する手法が知られている。しかしながら、i.v.感作は高度な手技を要する上、1匹あたりの処理時間が長く、動物実験を行なう上で課題も多い手法である。そこで本研究では、アレルギーの悪化との関連性が報告された IL-33 および IFN- γ を強力に誘導する乳酸菌ゲノム由来 CpG ODN (MsST) をアジュバントに使い、i.p.による投与で惹起する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に取り組んだ。食物抗原としてソバ (BW)、卵白アルブミン (OVA)、 α カゼイン (α -Casein) および β ラクトグロブリン (BLG) を使い、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 を用いた簡易的かつ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。

2. 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

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。様々な因子が敗血症発症に関与する中で、血小板活性化因子（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。この PAF を分解する酵素である PAF アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）は敗血症の治療標的分子として考えられている。CpG ODN は、CpG モチーフを有し、その側鎖の塩基を含めた組み合わせにより A, B, C の 3 つの Class に分類され、多彩な免疫効果を発揮することが知られている。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。まず脾臓細胞を用いた *in vitro* 試験において、Class A CpG ODN のみが強力に *paf-ah2* mRNA 発現および PAF-AH 活性を誘導することを明らかにした。また腹腔内マクロファージを用いた試験においても同様の結果を得た。次に、PAF により誘導され、敗血症症状の 1 つとして知られる播種性血管内凝固症候群（DIC）モデルを用いて、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。続いて、脾臓細胞を用いた *in vitro* 試験において、Class A CpG ODN は敗血症の起因菌となるグラム陰性菌の細胞壁構成成分である LPS により誘導される炎症応答を抑制することを示した。さらに LPS により誘導するエンドトキシンショックモデルを用いて、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。