# 信州大学審査学位論文

# 乳酸菌組換え体による 炎症および腫瘍免疫の制御に関する研究

令和3年9月

生井楓

# 目次

第1章	序論	2
	インターロイキン1受容体アンタゴニストを分泌する乳酸菌組	
の構築と	と急性大腸炎モデルマウスにおける抗炎症効果の検証	5
緒言		5
材料及	及び方法	7
結果		18
考察		29
第3章	抗 CTLA-4 低分子抗体を産生する乳酸菌組換え体の構築	34
緒言		34
材料及	及び方法	36
結果		39
考察		45
第4章	結論	48
参考文献	状	54
謝辞		69
発表論ス	文 文	70

人類の長い歴史の中で、微生物は感染症の原因もしくは様々な疾患を引き起こす要因として見なされてきた。実際、いくつかの微生物によって引き起こされる疾病は現在も問題となっており、食中毒の様に軽度なもの(1)から、Campylobacter jejuni 等の病原体によって引き起こされる自己免疫疾患のギランバレー症候群(2)や敗血症(3)といった重度なものまで幅広く存在する。これら微生物との戦いは抗生物質(Antibiotics)の登場によって大きく変化し、疾患のある程度の制御が可能となった(4)。また、この病原性微生物を死滅させる抗生物質が放線菌などの他の微生物によって産生されることは非常に興味深い点だと言える(5)。しかし、抗生物質に対する耐性菌の出現は、微生物の遺伝的浮動や抗生物質の選択圧を考えれば当然の結果であり、多剤耐性菌への対策は微生物学の分野だけで無く、多くの領域で研究の対象となっている(6)。

薬剤耐性菌の出現から、抗生物質の乱用が避けられるようになり、その中で微生物の制御を微生物で行う生物製剤の利用が注目された。プロバイオティクス(Probiotics)はこのような背景の中誕生した概念であり、Antibiotics に対する言葉として使用されている。実際、Probiotics の代表である乳酸菌(Lactic acid bacteria)は乳酸産生による病原性細菌の生育阻害(7)や、上皮細胞への優占的なコロニー化により他の微生物を排除するような効果(8)があることが分かっている。プロバイオティクスの機能性はこれだけにとどまらず、経口投与した宿主の免疫機能を調節したり、代謝機能を促進したりするなど宿主の健康を維持・増進する効果を有することが明らかとなっている(9)。そのため、現在のプロバイオティクスは「live microorganisms that, when administrated in adequate amounts, confer a health benefit on the host(適正量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体)」と定義されている(10)。

近年の次世代シーケンサーの目覚ましい発展は、環境中のメタゲノムの解析や培養困難な微生物の解析を可能にした(11)。その結果として、それまでは明らかにされていなかった腸内細菌叢の役割がだんだんと理解され始め、今では腸内細菌叢は宿主の臓器の一つとして認識されるまでに至っている(12)。腸内細菌叢は単に難消化性物質の代謝に関与しているだけでなく、宿主の発達に重要であり(13)、腸内細菌叢の恒常性の破綻は宿主の恒常性の破綻に直結している。実際、マウスを用いた実験において、肥満モデルの菌叢を移植することで、

そのマウスも体重が増加してしまうことなどが明らかとなっており腸内細菌叢の重要性が示されている(14)。腸内細菌叢からは新たな有用微生物が多く見つかっており、これらを新たなプロバイオティクスとして利用する為に多くの研究が進められている(15, 16)。

プロバイオティクスとして広く認識されている微生物の多くは Lactobacillus 属や Bifidobacterium 属に属している。これら微生物はその長い利用の歴史から、 アメリカ食品医薬品局(Food and Drug Administration; FDA)においては Generally Recognized as Safe (GRAS) 微生物であると認定されていると共に、 欧州食品安全機関(European Food Safety Authority; EFSA)においては Qualified presumption of safety (QPS) のステータスを与えられている(10, 17)。これらの ことから、多くの食品や健康食品の添加物として、プロバイオティクスは利用、 消費されている。しかし、次世代シーケンサーの発達により見出された新たな 有用微生物には乳酸菌などのプロバイオティクスとは異なり、その利用には高 いハードルがある(18)。さらに、近年の遺伝子工学の発展はプロバイオティク スやその他の微生物の有用性向上に寄与しており、様々な組換え微生物が作製 されている。これらのような、利用の歴史が短く、一般にプロバイオティクス と見なされていない微生物の利用・研究の促進を目的として、Next-generation probiotics (NGPs) の概念が提唱された(18)。NGPs はさらに、食品や添加物と しての利用ではなく、バイオ医薬品としての利用を見据えている。バイオ医薬 品としての利用を目的とした有用微生物や遺伝子組換え微生物は Microbial therapeutics と呼ばれ、注目されている(19)。NGPs や Microbial therapeutics はプ ロバイオティクス等の有用微生物を元に開発されるが、消費者の視点に立って みると、プロバイオティクスとは大きくかけ離れていると言える。実際、遺伝 子工学を適用した微生物の食品としての利用は難しく、社会的にも望まれるも のではない。NGPs や Microbial therapeutics は医薬品の枠組みの中で、利用され ることが予想される。

微生物を用いた Microbial therapeutics の一つに糞便移植(fecal microbiota transplant; FMT)がある。腸内細菌叢の恒常性は宿主の恒常性に直結している為、破綻した腸内細菌叢に対して、健常者の菌叢を移植することで、その恒常性を回復するというものである(20)。 Clostridium difficile 感染に対する FMT は一定の有効性を示しており、Microbial therapeutics の一つとして認識されている(21)。さらに、プロバイオティクスとして知られている乳酸菌に対して遺伝子

工学の技術を適用することで、様々なタンパク質を産生可能となった乳酸菌組換え体(Genetically modified lactic acid bacteria; gmLAB)もまた、NGPs に分類されていると共に、Microbial therapeutics としての利用が研究されている(22)。gmLABは一般的な組換えタンパク質発現宿主に用いられる大腸菌とは異なり、リポ多糖(LPS)などの内毒素を有していないことから、そのまま経口・経鼻投与が可能である。そのため、gmLABは菌体からの目的タンパク質の精製が必要なく、コスト的な利点がある。さらに、乳酸菌は胃酸や胆汁酸に対する耐性を有していることから、菌体内の組換えタンパク質を宿主腸管内の消化から守ることが出来る。また、宿主の腸管内に定着可能な乳酸菌のgmLABへの応用は宿主内での自己増殖によって、より少ない投与回数での疾患予防・軽減が期待できる。乳酸菌のアジュバントとしての機能性もまた、Microbial therapeuticsとしての利点に挙げられる(23)。

上記の通り、gmLAB は Microbial therapeutics の宿主として、非常に魅力的であると言える。実際、gmLABを用いたいくつかの臨床試験が行われており、糖尿病や炎症に対する Microbial therapeutics としての承認が期待されている。しかし、未だにその有効性を強力に示し、承認を受けた gmLAB は存在しない。本研究では gmLAB に基づく Microbial therapeutics 研究を後押しする為の基礎的知見の提供を目的として、炎症性腸疾患及びがんに対する gmLAB を構築した。

第2章 インターロイキン1受容体アンタゴニストを分泌する乳酸菌組換え体 の構築と急性大腸炎モデルマウスにおける抗炎症効果の検証

# 緒言

現在、炎症性腸疾患(Inflammatory bowel disease; IBD)の世界的な増加が問題となっており、特に急速に西洋化の進む発展途上国の IBD 患者の増加によって、深刻な世界的パンデミック発生の危険性が指摘されている(24)。IBD は腸管で起こる慢性炎症疾患で、潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis)とクローン病(Crohn's disease)の 2 つに大別される(25)。症状として、下痢や血便等が知られているが、その根本的な原因は未だ明らかにされていない。

近年の研究において、潰瘍性大腸炎やクローン病患者の腸管粘膜における病 変部位の症状の悪化具合とインターロイキン(Interleukin; IL)1β を発現する単 球の存在量との間に正の相関があることが見いだされた(26, 27)。IL-1 には IL-1αとIL-1βがあるが、IL-1βは主にマクロファージ等の免疫細胞が産生する炎症 性サイトカインとして知られている(28)。IL-1 のシグナルは様々な分子によっ て制御されているが、内因性の受容体アンタゴニスト (IL-1 receptor antagonist; IL-1Ra) は特に重要な役割を果たしている。IL-1Ra は IL-1β と同様に主に免疫 細胞より産生され、IL-1 受容体に結合する。IL-1 が受容体に結合するとその後 の炎症反応が促進されるが、IL-1Ra が受容体に結合してもその後の反応は誘導 されない為、IL-1Ra は過剰な IL-1 シグナルが引き起こされないよう調節してい る(29)。この IL-1 と IL-1Ra のバランスが免疫反応の恒常性維持には重要である が、IBD 患者の消化管ではこのバランスの不均衡が引き起こされていることが 報告されている(30)。また、IL-1Ra ノックアウトマウスを用いた研究では、同 マウスが自発的に IBD 様症状を示すことが分かっている(31)。これまでに、IL-1Ra や抗 IL-1 抗体を用いた IL-1 シグナリングを標的とした前臨床試験が実施さ れており、IBD 及び炎症に対するその有効性が示されている(32-34)。これらの 実験的成功を受けて、アナキンラ(Anakinra; 組換えヒト IL-1Ra)の皮下投与を 用いた臨床試験が実施されたが、5.1%の患者において深刻な副作用が観察され るなど、その利用には課題がある(35)。そこで、IL-1Ra を皮下投与等の全身投 与ではなく、炎症部位の消化管に直接運搬することが出来れば、副作用を抑制 できると共に、より効率的に IL-1 シグナルを抑制できるのではないかと考えた。 これらの課題に対する戦略として、gmLABを用いた IL-1Raの産生及び運搬は非常に魅力的であると言える(22)。実際、IL-1Raの精製が不要である点やその培養及びタンパク質産生誘導に高度な技術を必要としない点は gmLAB を利用する大きな利点として挙げられるだろう。さらに、前章で述べたように gmLAB は Microbial therapeutics や NGPs として人々の健康維持増進のツールとして期待されている(18, 19)。加えて、タンパク質そのものを経口的に投与した場合と比較して、gmLABにタンパク質を運搬させるとより少ない量のタンパク質量で同等の効果が得られることが分かっている(36, 37)。以上のことを踏まえて、本章では IBD に対する効果的でより安価な予防・軽減戦略を提案することを目的として、IL-1Raを分泌する gmLABを構築し、その効果を IBD モデルマウスとして広く知られているデキストラン硫酸ナトリウム(dextran sulfate sodium; DSS)誘導性急性大腸炎モデルマウスを用いて検証したので報告する。

# 材料及び方法

# 1. プラスミド、菌株及び培養条件

乳酸菌用遺伝子発現ベクターは Shigemori らによって構築された pNA8148#2: SEC (Fig. 1a) を用いた(38)。pNA8148#2: SEC は市販の乳酸菌用発現ベクターである pNZ8148 (MoBiTec GmbH, Gottingen, Germany) のマルチクローニングサイト (multi cloning site; MCS) の上流に分泌用のシグナルペプチドである SP<sub>usp45</sub> を組込んだ分泌用ベクターである。

本研究における組換えタンパク質発現宿主として、*Lactococcus* (*L.*) *lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (NZ9000) (MoBiTec GmbH) を用いた。NZ9000 は Nisin 誘導型遺伝子発現システムである pNZ8148 の利用に最適化された乳酸菌株で、野生株の *L. lactis* subsp. MG1363 より構築された組換え乳酸菌である。乳酸菌は 0.5%のグルコース(Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)を含む M17 培地(Becton, Dickinson and Company, MD, USA)(GM17) にて 30°C 条件下で静置培養した。また、pNZ8148 シリーズのプラスミドは選択マーカーとしてクロラムフェニコール耐性遺伝子(Chloramphenicol acetyltransferase; CAT)を有している為、gmLAB の培養は GM17 に chloramphenicol(Nacalai Tesque)を終濃度 10 μg/mLで添加した GM17 cm にて行った。

組換えタンパク質発現ベクターの構築の際には、*Escherichia coli* MC1061 (TaKaRa Bio, Shiga, Japan)を用いた。MC1061の培養は、Luria-Bertani (LB) 培地 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を用いて37°C条件下で浸透培養(220 rpm)にて行った。また、必要に応じてchloramphenicol(25 μg/mL)を添加した (LBcm)。

#### 2. 遺伝子発現ベクターの構築

遺伝子組換え実験は、「信州大学遺伝子組換え実験等安全管理規程」に則り、 機関長の承認を受けて法令・指針等の申請に基づいた制限環境下にて行った (承認番号:16-032)。

マウス (m) IL-1Ra遺伝子 (GenBank accession #: NM\_001039701.3) は *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 のコドン使用頻度に最適化し、Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan) に合成を委託した。合成した遺伝子はサブクローンベクターである pTAKN-2 の *Hind* III 及び *Kpn* I の間にクローニングされた。

mIL-1Ra の両端を制限酵素 (Hind III 及び Kpn I) (TaKaRa Bio) で切断し、1%

agarose (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) ゲルを用いた電気泳動を行い、DNA 断片を確認した。mIL-1Ra の DNA 断片は FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) を用いてゲル中から精製した。また、遺伝子発現ベクターの pNZ8148#2: SEC も同様に制限酵素処理、電気泳動を行った。

得られた mIL-1Ra 及び pNZ8148#2: SEC の断片の混合液(7.5 μL)と同量の Ligation high Ver.2(TOYOBO, Osaka, Japan)を混合し、16°C、30 min 静置する ことでライゲーションを行った。その後、MC1061 に導入し、1.5 hr の浸透培養後、LBcm 寒天培地に塗布した。得られたコロニーを pNZ8148 特異的プライマー(Table M1; F3126, R340)を用いたコロニーダイレクト PCR にて解析した。コロニーは LBcm 液体培地で振盪培養し、FastGene Plasmid Mini Kit(NIPPON Genetics)を用いてプラスミドを抽出・精製した。精製したプラスミドは F3126, R340 を用いたシーケンス解析(Eurofins Genomics K.K.)により、挿入遺伝子の変異・欠損の有無を確認した。

# 3. gmLAB の構築

構築した mIL-1Ra 発現分泌ベクター (pNZ8148#2: SEC-mIL1Ra; Fig. 1b) を NZ9000 に導入し gmLAB (NZ-IL1Ra と命名) を構築した。

NZ9000 を前培養後、GM17 に菌液を添加し(終濃度 5%)Optical Density 600 nm(OD $_{600}$ )が 0.2-0.3 になるまで培養した(10 mL スケール)。得られた菌液を遠心(3000 g, 4°C, 20 min)し、集菌した。Electroporation buffer(0.5 M Sucrose, 10% Glycerol)での遠心洗浄(6000 g, 4°C, 5 min)を 2 回行い、200  $\mu$ L の Electroporation buffer に再懸濁した。

氷冷したエレクトロポレーションキュベット (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) に調製した NZ9000 及びプラスミドベクター (100-500 ng) を添加し、Gene Pulser Xcell (Bio-Rad Laboratories) を用いてパルス (2,000 V, 25 μF, 200 Ω) した。その後、氷冷した 500 μL の GM17 SOC (20 mM MgCl<sub>2</sub> [Nacalai Tesque], 2 mM CaCl<sub>2</sub> [Nacalai Tesque] in GM17)を添加し、氷上に 5 min 静置した。30°C で 2 hr 培養後、GM17cm 寒天培地に塗布し、overnight で培養した。得られたコロニーを釣菌し、20%で Glycerol (Nacalai Tescue) を含む GM17cm にて凍結保存した (-80°C)。

また、NZ-IL1Ra の構築と同様に空のベクターである pNZ8148#2: SEC を NZ9000 に導入し、ベクターコントロール gmLAB (NZ-VC) も構築した。

# 4. 組換え遺伝子発現の誘導と組換え(r) mIL-1Ra の検出

前培養した gmLAB(NZ-IL1Ra 及び NZ-VC)を終濃度 5%となるように GM17cm に添加し、OD $_{600}$  が 0.4 になるまで培養した(1-1.5 hr)。遺伝子発現誘 導物質である Nisin(MoBiTec GmbH)を終濃度 1.25 ng/mL となるように添加し、 3 hr 培養した。菌体と培養液上清を遠心分離(8000 g, 4°C, 1 min)にて回収し、 それぞれのタンパク質溶液を調製した。

菌体は Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-Cl [Nacalai Tesque], 150 mM NaCl [Nacalai Tesque], pH 7.5)で洗浄後、TBS+PIC(protease inhibitor cocktail; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)に再懸濁した。ガラスビーズ (0.2 mmφ; ASONE, Osaka, Japan)を添加し、ビーズクラッシャー(μT-12; TAITEC, Saitama, Japan)にて菌体を破砕した(3200 rpm, 180 sec [60 sec, on ice×3])。その後、菌体破砕液を回収した(20000 g, 4°C, 15 min)。

1500 μL の培養液上清に 300 μL の trichloroacetic acid (Wako, Osaka, Japan) を添加し、氷上で 1 hr 静置した。遠心分離(20000 g, 4°C, 15 min)により、沈殿を回収し、400 μL の acetone(Wako)にて 2 回洗浄した。55°C に加温し、沈殿を乾燥させた後、100 μL の 0.05 M NaOH(Nacalai Tescue)に再懸濁した。

菌体及び培養液上清より調製したサンプルは等量の SDS sample buffer (Wako) と混合し、95℃、5 min 加温した。その後、サンプルを sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)に供し、タンパク質を分離した。 SDS-PAGE には 15%の分離ゲル、及び濃縮ゲル(Table M2) を用いた。サンプ ルをウェルに添加後 (菌体; 8 μL, 培養液上清; 20 μL)、Running buffer (Table M3) 中でサンプル濃縮(10 mA)後、分離した(200 V, 40 min)。分離したタンパク 質は Coomassie Brilliant Blue (CBB) (0.25% Brilliant Blue R [TCI, Tokyo, Japan], 40% methanol [Wako], 7% acetic acid [Wako]) にて染色もしくは Amersham Hybond P PVDF membranes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)に転写した。転写は Transfer buffer (Table M4) 中で通電 (100 V, 1 hr) し行った。転写後の PVDF 膜 は菌体画分と培養液上清画分に分け、それぞれ5または3%のスキムミルク含有 TBS-T (0.05% Tween 20 [Nacalai Tesque] in TBS) で1 hr ブロッキングした。TBS-Tで 10 min の振盪洗浄を 3 回行い、一次抗体溶液 (mouse anti-His-tag antibody [BioLegend, San Diego, CA, USA]: TBS-T=1:1,000) にて 4°C で一晩振盪した。 TBS-Tで10minの振盪洗浄を3回行った。その後、二次抗体液(HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody [Sigma-Aldrich, MO, USA]: TBS-T=1:5,000) にて

室温で 1 hr 振盪した。TBS-T で 10 min の振盪洗浄を 3 回行った。振盪洗浄後、Amersham ECL Prime Western Blotting Analysis System (GE Healthcare) を PVDF 膜にかけ、ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare) を用いてバンドを検出した。

菌体破砕液中の rmIL-1Ra の定量は enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて行った。Nisin 添加後、48 hr 培養した培養液から菌体破砕液と培養液上清を調製・回収した。それぞれを TBS+PIC にて希釈し、ELISA(Mouse IL-1Ra/IL-1F3 ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)に供した。

# 5. rmIL-1Ra の精製

NZ-IL1Ra を 1 L スケールで培養し、Nisin を添加することで組換えタンパク質の発現を誘導した。遠心分離(3000 g, 4°C, 20 min)により培養液上清を回収し、Supernatant-binding buffer (20 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, 500 mM NaCl, and 20 mM imidazole in the supernatant)を調製し、フィルター(0.45  $\mu$ m; Merck KGaA)に通した。

精製は AKTA pure (1 mL/min; GE Healthcare)、His Trap HP column (GE Healthcare)を用いて行った。His Trap HP column を平均化後、調製した Supernatant-binding buffer を通した。カラムを binding buffer で洗浄後(20-column volume [CV])、カラムに吸着したタンパク質を 0-500 mM のイミダゾールのグラジェントを 35 CV で流し、溶出した。得られた各画分(supernatant, flow-through, wash, and eluate: E-1 to E-5)を上記の通り SDS-PAGE 及び Western blot に供し、目的タンパク質の有無を確認した。

rmIL-1Ra を含む目的の画分(E-3)は phosphate-buffered saline (PBS) (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, and 1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [pH 7.4])で透析後、ELISA(Mouse IL-1Ra/IL-1F3 ELISA, R&D Systems)にて濃度を測定した。

#### 6. EL4.NOB-1 の培養条件

C57BL/6N 由来のリンパ腫由来細胞株である EL4.NOB-1 細胞(Sigma-Aldrich)は complete RPMI 1640 medium(RPMI 1640 [Sigma-Aldrich] containing fetal calf serum [10%, Sigma-Aldrich], streptomycin [100 mg/mL; Nacalai Tesque], penicillin [100 U/mL; Nacalai Tesque], HEPES [25 mM; Nacalai Tesque], nonessential amino acids, sodium pyruvate [1.0 mM; Nacalai Tesque], and 2-mercaptoethanol [0.0035%; Nacalai Tesque])にて培養した。EL4.NOB-1 細胞は 37°C, 5% CO2 条件下で培養し、3 日

# に1度継代した。

## 7. rmIL-1Ra の生理活性試験

EL4.NOB-1 細胞(2×10<sup>5</sup> cells/170 μL)を 96 well plate に播種し、3 hr 培養した。 その後、IL-1β/IL-1F2 (200 pg/10 μL: R&D Systems)及び様々な濃度(37.25–250 ng/20 μL)の精製 rmIL-1Ra、市販の mIL-1Ra(R&D Systems)、ヒト(h)IL-1Ra(R&D Systems)を添加し、24 hr 培養した。培養後、上清を回収し、IL-2 濃度を ELISA(R&D Systems)で測定した。

#### 8. マウスと倫理的承認

C57BL/6マウス(雌、7週齢)を Japan SLC(Shizuoka, Japan)から購入し、光 と温度を制御した条件下で 2 週間予備飼育した。 マウスには、標準的な食餌と オートクレーブ処理した水を自由に与えた。動物実験は、「信州大学動物実験 等実施規程」に則り、機関長の承認を受けて法令・指針等の申請に基づいた制 限環境下にて実施した(承認番号: 240078)。

# 9. NZ-IL1Ra の経口投与による rmIL-1Ra の腸管到達試験

マウス(n=3-4)を非投与群(non-administration group; N.A.)と NZ-IL1Ra 投与群(NZ-IL1Ra)に分けた。NZ-IL1Ra は 50 mL スケールで上記と同様の方法にて遺伝子発現を誘導し、菌液を調製した。NZ-IL1Ra を 1×10<sup>10</sup> CFU/200 μL となるように調製し、30 min 毎に 10 回経口投与を行った。最後の経口投与から 30 min 後にマウスを安楽死させ、盲腸と結腸の内容物、及び血清を回収した。盲腸及び結腸の内容物は 200 mg/mL となるように PBS に懸濁し、GM17cm 寒天倍期に画線した後、2 目間培養した。得られたコロニーのうちランダムに 8 つのシングルコロニーを釣菌し、ユニバーサルプライマー(27F, 1492R; Table M1)を用いて PCR(Table M5)にかけ 16S rRNA を増幅した。得られた DNA 断片をシーケンス解析(Eurofins Genomics K.K.)に供し配列決定後、BLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)(39)を用いて菌種を同定した。盲腸及び結腸の内容物の PBS 懸濁液を遠心し(20000 g, 4°C, 15 min)、上清を回収した。上清中及び血清中の mIL-1Ra 濃度は Mouse IL-1Ra/IL-1F3 ELISA(R&D Systems)にて測定した。

10. DSS 誘導性急性大腸炎モデルマウスの構築と gmLAB の経口投与

C57BL / 6 マウス(雌、7 週齢)を Japan SLC(Shizuoka, Japan)から購入後、2 週間予備飼育し、NZ-VC 群(n=18)と NZ-IL1Ra 群(n=18)に分けた。それぞれのマウスに対して DSS(MW = 36-50 kDa; MP Biomedicals, OH, USA)を 3%で含む滅菌水を 5 日間自由飲水させ、大腸炎を誘導した(Day 0-5)。5 日目に通常の滅菌水に切り替え、実験終了まで与えた(Day 5-11)。体重と糞の硬さ、血便の程度を観察し、症状が重いほど値が大きくなるようにスコア化した(体重:0-4, 糞の硬さ:0-3, 血便:0-3)。これら 3 項目のスコアを合計したものを Disease Activity Index(DAI)スコア(0-10)とし(40)、で大腸炎の重症度を評価した。また、最終日(Day 11)にはマウスを安楽死させ、大腸の長さを測定後、大腸、腸間膜リンパ節(mesenteric lymph nodes; MLNs)、及び盲腸内容物を回収した。

gmLAB(NZ-VC, NZ-IL1Ra)は 100 mL スケールで培養し、上記の通り Nisin を添加することで遺伝子発現を誘導した。それぞれの gmLAB を  $5.0\times10^{10}$  CFU/mL になるよう調製し、マウスに対して  $200\,\mu$ L( $1.0\times10^{10}$  CFU/mouse)を経口投与した(Day 0-11)。

# 11. 病理組織学的解析

摘出した大腸遠位部を O.C.T. Compound (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) に 凍結包埋し、Leica CM3050 S cryostat (Leica Biosystems, Newcastle, UK) を用いて薄切を行った (6 μm)。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、BZ-X800 microscope (Keyence, Osaka, Japan) にて観察した。また、Hybrid Cell Count System in the BZ-X800 viewer (Keyence) を用いて、炎症により肥厚した 粘膜組織面積を測定した。

# 12. DSS モデルマウスにおける炎症性サイトカインの解析

各炎症性サイトカイン(IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17)の mRNA 発現量は Real-time 定量的 PCR(RT-qPCR)にて行った。大腸及び MLN から Trizol 法(41) を用いて total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent Kit(TaKaRa Bio)を用いて cDNA を合成した。内部標準物質の β-actin 及び炎症性サイトカインの特異的プライマーは TaKaRa Bio より購入した。

MLN を brefeldin A (Nacalai Tescue), ionomycin (Nacalai Tescue), and phorbol 12-myristate 13-acetate (Nacalai Tescue) を含む complete RPMI 1640 で 4 hr 培養

し、4%の Paraformaldehyde (Nacalai Tescue) で固定した。細胞を Alexa Fluor 488 anti-mouse CD4 (CAT# 100423; BioLegend) 及び PerCP/Cy5.5 anti-mouse IL-17A antibodies (CAT# 506919; BioLegend)で染色し(4°C, 60 min)、Cell Sorter SH800 (Sony, Tokyo, Japan) を用いて CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>細胞数を測定した。得られたデータは FlowJo software (LLC, Ashland, OR, USA)を用いて解析した。

# 13. 次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析

最終日 (Day 11) に回収した盲腸内容物から QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, CA, USA) を用いて DNA を抽出した。アンプリコンPCR(Table M6)及びインデックス PCR(Table M7)を行いライブラリー調製後、illumina Miseqを用いた外注委託(TaKaRa)にて菌叢を解析した。得られた配列データ(fastq)の品質管理及び使用したプライマーの除去は DADA2(42)にて行った。データ解析は Qiime2 パイプライン(43)を用いて行い、盲腸内細菌叢組成、α 及び β 多様性を解析した。細菌叢の taxonomy assignment は Greengenes データベース (Greengenes 13 8 99% operational taxonomic units [OTUs])を用いて行った。

# 14. 統計解析

全ての統計解析は GraphPad Prism software (version 8, GraphPad, CA, USA)を用いて行い、p<0.05 を有意差とした。 *in vitro* の rmIL-1Ra 生理活性試験では、一元配置分散分析法及び Tukey-Kramer 法を用いて p 値を算出した。 *in vivo* の試験では ROUT 法にて外れ値検出を行った後、t-test にて p 値を算出した。

Table M1 本研究で使用したプライマー配列

Name	5'-sequence-3'	Length (bp)
F3126	TGCCCCGTTAGTTGAAGAAG	20
R340	TCAATCAAAGCAACACGTGC	20
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20
1492R	GGCTACCTTGTTACGACTT	19
16S rRNA F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACA	50
105 IKNA F	GCCTACGGGNGGCWGCAG	50
16S rRNA R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGAC	5.5
105 IKNA K	AGGACTACHVGGGTATCTAATCC	55

Table M2 ポリアクリルアミドゲルの組成

15%分離ゲル	
30% (w/v) acrylamide (Wako)	$4,\!800~\mu\mathrm{L}$
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	$2{,}000~\mu\mathrm{L}$
10% sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich)	80 μL
10% ammonium persulfate (Sigma-Aldrich)	27 μL
Tetramethylethylenediamine (Wako)	4 μL
Water	1,120 μL
濃縮ゲル	
30% (w/v) acrylamide (Wako)	$400~\mu L$
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	625 μL
10% sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich)	25 μL
10% ammonium persulfate (Sigma-Aldrich)	8.3 μL
Tetramethylethylenediamine (Wako)	2.5 μL
Water	1,440 μL

**Table M3** SDS Running buffer の組成

Tris (Nacalai Tesque)	3.0 g
Glycine (Nacalai Tesque)	14.4 g
Sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich)	1.0 g
Water	up to 1 L

# **Table M4** Transfer buffer の組成

Tris (Nacalai Tesque)	3.0 g
Glycine (Nacalai Tesque)	14.4 g
Methanol (Nacalai Tesque)	100 mL
Water	up to 1 L

Table M5 PCR 反応の組成及び条件

Component of reaction solution	
KOD Plus Neo buffer (TOYOBO)	5 μL
dNTPs (TOYOBO)	5 μL
$MgSO_4(TOYOBO)$	3 μL
Primer Mixture (10 μM each)	$2~\mu L$
KOD Plus Neo buffer (TOYOBO)	1 μL
Template DNA solution (10 ng/µL, pTAKN-2-mOC)	0.1 μL
Water	33.9 μL
Condition for reaction	
95°C	5 min
95°C	30 sec
65°C	30 sec
72°C	30 sec
5 cycles	
95°C	30 sec
60°C	30 sec
72°C	30 sec
10 cycles	
95°C	30 sec
55°C	30 sec
72°C	30 sec
25 cycles	
72°C	3 min
12°C	hold

Table M6 アンプリコン PCR 反応の組成及び条件

Component of reaction solution	
Microbiota DNA (5 ng/μL)	2.5 μL
16S rRNA F (1 μM)	5 μL
16S rRNA R (1 μM)	5 μL
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Sigma-Aldrich)	12.5 μL
Condition for reaction	
95°C	3 min
95°C	30 sec
55°C	30 sec
72°C	30 sec
25 cycles	
72°C	5 min
4°C	hold

# Table M7 インデックス PCR 反応の組成及び条件

Component of reaction solution	
DNA	5 μL
Nextera XT index primer1 (N7xx) (illumina, CA, USA)	5 μL
Nextera XT index primer2 (S5xx) (illumina)	5 μL
2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Sigma-Aldrich)	25 μL
Water	10 μL
Condition for reaction	
95°C	3 min
95°C	30 sec
55°C	30 sec
55°C 72°C	30 sec 30 sec
72°C	

# 1. rmIL-1Ra を高産生する gmLAB の構築

mIL-1Ra をコードする DNA 配列を乳酸菌用遺伝子発現ベクター (pNZ8148#2: SEC; Fig. 1a) に挿入することで、IL-1Ra 発現ベクターである pNZ8148#2: SECmIL1Ra (Fig. 1b) を構築した。構築したベクターもしくは元のベクターを電気 穿孔法を用いて NZ9000 に導入し、ベクターコントロール gmLAB (NZ-VC) も しくは mIL-1Ra 発現 gmLAB (NZ-IL1Ra) を構築した。Nisin を添加した培地で 培養することで、NZ-IL1Ra の細胞画分において rmIL-1Ra の分泌前駆体のサイ ズに一致するバンドを Western blot により検出した (24.5 kDa, NZ-IL1Ra (+), Fig. 1d)。一方で、NZ-VC や Nisin 刺激を行わなかった NZ-IL1Ra の細胞画分ではバ ンドは検出されなかった(Fig. 1d)。Nisin 刺激を行った NZ-IL1Ra の培養液上清 画分においては、分泌型の rmIL-1Ra のサイズに一致するバンドを検出した (21.8 kDa, NZ-IL1Ra (+), Fig. 1d)。しかし、同様のバンドは NZ-VC 及び Nisin 刺激を行わなかった NZ-IL1Ra では検出されなかった。これらの結果は、NZ-IL1Ra が Nisin の刺激依存的に rmIL-1Ra を発現し分泌していることを示してい る。また、ELISA を用いて発現量・分泌量を測定したところ、細胞画分におい て 100.75 ± 23.4 μg/mg、培養液上清画分においては 2.00 ± 0.73 mg/L という顕著 な rmIL-1Ra の量を確認した。以上のことから、Nisin 刺激依存的に rmIL-1Ra を 多量に分泌する gmLAB の構築に成功した。

#### 2. rmIL-1Ra の精製と生理活性試験

rmIL-1Ra は NZ-IL1Ra の培養液上清より精製し、精製過程で得られた 280 nm における吸光度( $A_{280}$ )のクロマトグラフを示す(Fig. 2a)。吸光度の値に基づき、得られた画分を 5 つの画分に分けた(E-1~E-5)。精製タンパク質の精製度はSDS-PAGE 及び CBB 染色を用いて行い(Fig. 2c)、rmIL-1Ra の検出は Western blot(Fig. 2b)にて行った。分泌型の rmIL-1Ra のサイズに一致するバンド(21.8 kDa)は E-2 から E-4 にかけて確認され、特に E-3 画分における rmIL-1Ra の精製度が高いことが示された。そのため、今後の試験においては PBS による透析を行った E-3 画分を精製 rmIL-1Ra とし、*in vitro* 試験に使用した。また、ELISA にて rmIL-1Ra の量を測定したところ、50  $\mu$ g の rmIL-1Ra が得られた。

精製 rmIL-1Ra における IL-1 シグナル阻害活性の測定は EL4.NOB-1 細胞(44)

を用いた *in vitro* 試験にて行った。EL4.NOB-1 細胞を市販の IL-1 $\beta$  で刺激すると、IL-2 の分泌が促進されることが示された一方で、無刺激の場合は IL-2 の分泌は見られなかった(Fig. 3)。IL-1 $\beta$  の刺激によって誘導される IL-2 分泌は精製 rmIL-1Ra、もしくは市販の IL-1Ra(マウス、ヒト)の添加量を増加していくことで、その濃度依存的に有意に減少した(Fig. 3)。また、IL-2 の分泌阻害の効果は、mIL-1Ra > hIL-1Ra > 精製 rmIL-1Ra の順であった(Fig. 3)。

# 3. NZ-IL1Ra の経口投与による rmIL-1Ra の腸管到達試験

NZ-IL1Ra を 30 min 毎、合計 10 回経口投与し、rmIL-1Ra の腸管到達試験を調査した。最後の経口投与の 30 min 後に血清及び盲腸、大腸の内容物を回収した (Fig. 4a)。回収した消化管内容物をGM17cm寒天培地に塗布したプレーティングアッセイでは、NZ-IL1Ra を経口投与した群では多数のコロニーが観察され、経口投与を行わなかった群ではコロニーは見られなかった (Fig. 4b)。得られたコロニーを無作為に選択し、16S rRNA 遺伝子領域を PCR にて増幅後、シーケンス解析に供した。結果として、全てのコロニーにおいて L. lactis との相同性 (100%)を示した。また、血清 mIL-1Ra は NZ-IL1Ra の経口投与により、劇的に上昇したと共に (Fig. 4c)、盲腸及び大腸の内容物中の mIL-1Ra 濃度も経口投与を行わなかった群と比較し有意に上昇した (Fig. 4d, e)。

### 4. 急性大腸炎モデルマウスに対する NZ-IL1Ra の経口投与試験

DSS 誘導性大腸炎モデルマウスに対して NZ-IL1Ra もしくは NZ-VC を経口投与した(Fig. 5a)。大腸炎の重篤度は体重及び DAI スコアを測定することで、評価した。また、実験最終日(Day 11)にマウスを安楽死させ、大腸を摘出し、その長さを測定した。

マウスに 3%DSS 滅菌水を自由飲水させることで、Day 5 から Day 8 にかけて、体重が著しく減少し、大腸炎が誘導されていることが確認された(Fig. 5b)。 Day 8 以降において、NZ-VC 経口投与群ではその後の体重増加があまり見られない一方で、NZ-IL1Ra 経口投与群では有意な体重の回復が確認された(Fig. 5b)。 DAI スコアに関しては、DSS 自由飲水の最終日である Day 5 の NZ-IL1Ra 経口投与群において、NZ-VC 経口投与群と比較し、その上昇が有意に抑制された。また、最終日の Day11 においても NZ-VC 経口投与群と比較し、NZ-IL1Ra 経口投与群では有意に減少した(Fig. 5c)。また、大腸炎の指標の一つである大

腸の長さにおいても、NZ-VC 経口投与群と比較し、NZ-IL1Ra 経口投与群においてその短縮が有意に抑制された(Fig. 5d)。摘出した大腸における HE 染色の結果では、NZ-VC 経口投与群で見られる免疫細胞の浸潤が NZ-IL1Ra 経口投与群で見られないだけでなく、粘膜組織面積においても NZ-IL1Ra 経口投与群では有意に改善した(Fig. 5e-g)。

# 5. NZ-IL1Ra 経口投与における炎症性サイトカインへの影響

IBD モデルにおいては、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  が過剰発現すると共に、Th17 の IL-17A が IL-1 シグナルの影響を強く受けることが知られている(45-48)。そのため、大腸と MLN を回収し、NZ-IL1Ra の抗炎症効果を検証した。また、MLN における CD4+ IL-17A+細胞はフローサイトメトリーにて測定した。結果として、NZ-IL1Ra 経口投与群においては NZ-VC 経口投与群と比較し、有意に CD4+ IL-17A+細胞の割合が減少した(Fig. 6 a-c)。

Total RNA を大腸及び MLN より抽出し、TNF-α、IFN-γ、そして IL-17A の mRNA 発現量を RT-qPCR にて測定した(Fig. 6 d-i)。MLN における TNF-α 発現を除き、炎症性サイトカインの mRNA 発現量は NZ-VC 経口投与群と比較し、NZ-IL1Ra 経口投与群にて減少傾向が見られた。特に、大腸における TNF-α 発現量と MLN における IFN-γ 発現量は有意に減少した(Fig. 6 e, g)。

# 6. NZ-IL1Ra 経口投与による腸内細菌叢への影響

IBD が消化管で発生する疾患であることを考慮し、DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおける腸内細菌叢を調査した。すなわち、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子のメタゲノム解析を用いて、NZ-IL1Ra 経口投与群と NZ-VC 経口投与群における腸内細菌叢の組成を解析した(Fig. 7a)。多様性解析においては、NZ-VC 経口投与群と比較し、NZ-IL1Ra の経口投与により、 $\alpha$  多様性 (observed OTUs) に変化は見られなかった(Fig. 7b)。同様に  $\beta$  多様性(Bray-Curtis)においても NZ-IL1Ra の経口投与により変化は見られなかった(Fig. 7c)。

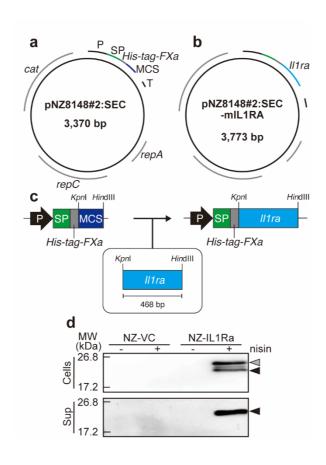


Figure 1 mIL-1Ra 発現ベクターの構築と rmIL-1Ra 発現の解析

a 乳酸菌用発現分泌ベクター(pNZ8148#2: SEC)の模式図。P, Nisin 誘導型プロモーター; SP, USP45 タンパク質のシグナルペプチド配列; His-tag, 6×ヒスチジンタグをコードする配列; FXa, Factor Xa 認識領域のコード配列; MCS,マルチクローニングサイト; T, ターミネーター; rep, 複製開始点; cat, クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子。b mIL-1Ra 発現分泌ベクター(pNZ8148#2: SEC-mIL1Ra)の模式図。Il1ra, MG1363 のコドン使用頻度に最適化した mIL-1Ra 配列。c mIL-1Ra 発現ベクターの構築スキーム。d 発現解析の結果。NZ-IL1Ra 及び NZ-VC を Nisin の存在 (+) もしくは非存在 (-) 下で培養し、Western blot にてタンパク質発現を解析した。矢頭(グレー): SP と IL-1Ra の複合体である mIL-1Ra 分泌前駆体(24.5 kDa)、矢頭(黒): 分泌体のmIL-1Ra (21.8 kDa)。

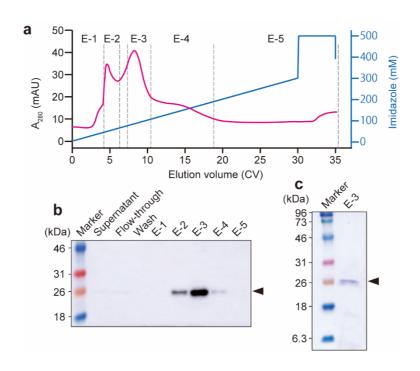


Figure 2 rmIL-1Ra の精製

a タンパク質溶出時におけるクロマトグラム。His-Trap column に結合したタンパク質を、imidazole を段階的に添加することで溶出した。溶出したタンパク質を 280 nm における吸光度に基づき、5 つの画分に分け、回収した(E-1~E-5)。b anti-His-tag antibody を用いた Western blot にて各画分における mIL-1Ra を検出した。 c E-3 画分における SDS-PAGE(CBB 染色)の結果。矢頭は分泌型の rmIL-1Ra を示す (21.8 kDa)。

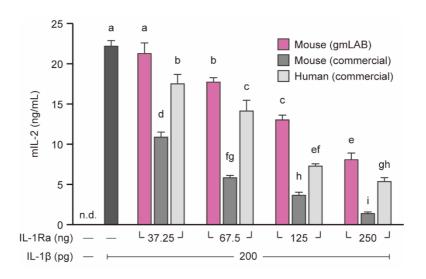


Figure 3 NZ-IL1Ra より精製した rmIL-1Ra の生理活性試験

EL4.NOB-1 cells ( $2\times10^5$  cells) を IL-1 $\beta$  (200 pg/well)及び様々な濃度(37.25-250 ng/well)の精製 rmIL-1Ra、mIL-1Ra、もしくは hIL-1Ra で刺激した。その後、上清中における IL-2 濃度を ELISA にて測定した。実験は独立した 2 回の測定にて行われ、データは平均 $\pm$ SD で示した。異符号間に有意差あり(p < 0.05)。n.d. = not detected. Mouse (gmLAB),rmIL-1Ra purified from NZ-IL1Ra; Mouse (commercial),commercially available mIl-1Ra; Human (commercial),commercially available hIl-1Ra.

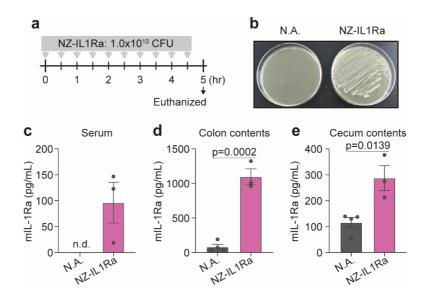


Figure 4 NZ-IL1Ra の経口投与による rmIL-1Ra の腸管送達試験

a NZ-IL1Ra の経口投与スケジュール。 b NZ-IL1Ra 経口投与群もしくは非投与群の大腸内容物を GM17cm 寒天培地に画線培養した。c, d, e 血清、大腸内容物、盲腸内容物中の mIL-1Ra 濃度。データは平均値±SE(n=3-4)で示す。それぞれのドットは一匹のマウスを示す。N.A., non-administration group; NZ-IL1Ra, NZ-IL1Ra administration group; n.d., not detected.

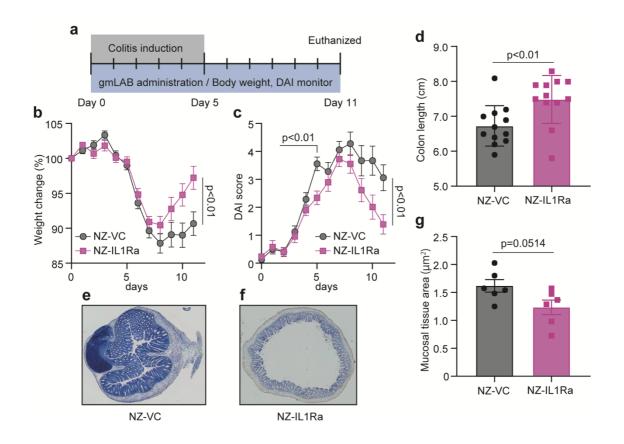


Figure 5 DSS 誘導性大腸炎モデルマウスに対する NZ-IL1Ra の経口投与の効果 a 大腸炎の誘導と NZ-IL1Ra の経口投与スケジュール。in vivo 試験は 3 回繰り返し行った(n=18)。b, c DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおける体重変化率と DAI スコアの推移。データは平均値±SE(n=18)で示す。Day 11 における p 値をそれぞれ示す。d Day 11 における大腸長の長さ。データは平均値±SE(n=12)で示し、それぞれのドットは一匹のマウスを表す。e, f 代表的な大腸組織の HE 染色画像(10× magnification)。e; NZ-VC, f; NZ-IL1Ra. g Day 11 における大腸の総粘膜面積。データは平均値±SE(n=6)で示し、それぞれのドットは一匹のマウスを表す。

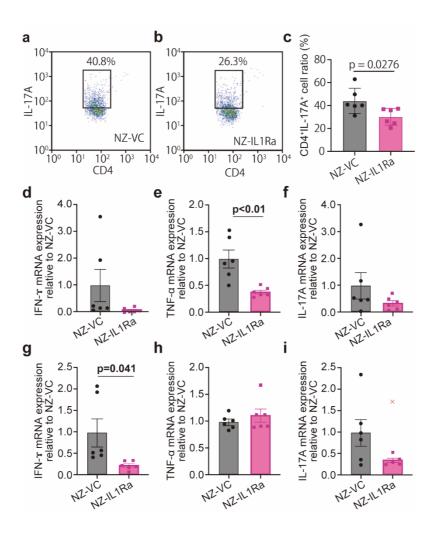


Figure 6 サイトカイン発現における NZ-IL1Ra の抗炎症効果

a-c Day 11 において摘出した MLN を Alexa Fluor488 anti-mouse CD4 antibody 及び PerCP/Cy5.5 anti-mouse IL-17A antibody で染色した。それぞれのフローサイトメトリーのドットは CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup>細胞を示す(NZ-VC (a) 、 NZ-IL1Ra (b))。 c CD4<sup>+</sup> IL-17A<sup>+</sup>細胞のデータを示す。データは平均値±SE (n=6) で示し、それぞれのドットは一匹のマウスを表す。d-i グラフは IFN- $\gamma$  (d, g)、TNF- $\alpha$  (e, h)、及び IL-17A(f, i) の大腸及びM L Nにおける mRNA 相対発現量をそれぞれ示す。値は NZ-VC 投与群における相対値で示す。データは平均値±SE (n=6) で示し、それぞれのドットは一匹のマウスを表す(×は外れ値を示す)。

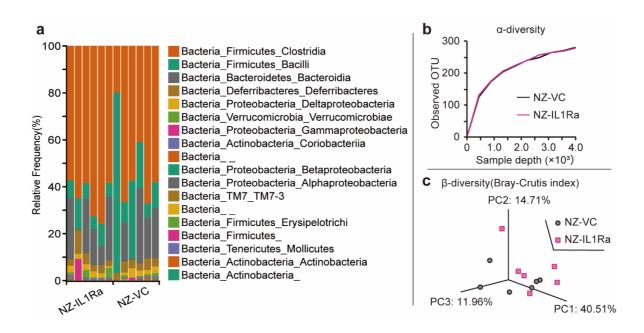


Figure 7 NZ-IL1Ra の盲腸内細菌叢に対する影響

a NZ-IL1Ra 経口投与群及び NZ-VC 経口投与群の盲腸内細菌叢の組成(綱レベル)(n=6)。盲腸内容物中の 16S rRNA における V3-V4 領域を増幅し、NGS 解析に供した。得られた配列データは Qiime2 パイプラインにて解析した。 b NZ-IL1Ra 経口投与群及び NZ-VC 経口投与群の  $\alpha$  多様性 (observed OTUs のレアファクションカーブ)(n=6)。 c NZ-IL1Ra 経口投与群及び NZ-VC 経口投与群の  $\beta$  多様性 (Bray-Curtis index) (n=6)。

Table 1 NICE-system により産生したインターロイキンの測定結果

Interleukin		Concentration (µg/L)	Reference	
IL-1Ra	(mouse)	2,000	This study	
IL-2	(mouse)	2	(49)	
	(porcine)	580	(50)	
IL-10	(mouse)	40	(51)	
IL-12	(mouse)	0.185	(52)	
	(mouse)	0.065	(53)	
IL-18	(mouse)	0.7	(54)	
IL-22	(human)	10	(55)	
IL-35	(mouse)	-	(56)	

#### 考察

gmLABは安価にタンパク質を産生可能なだけでなく、腸管粘膜に産生した目的 タンパク質を直接運搬することができる(22)。炎症の悪化に関与する IL-1 シグ ナルを制御することで、IBD を抑制することを目的として、本研究では rmIL-1Raを高分泌するgmLAB(NZ-IL1Ra)を構築し、急性大腸炎モデルマウスを用 いてその効果を検証した。本研究で用いた乳酸菌用遺伝子発現ベクターの発現 カセットはバクテリオシンの一種である Nisin によってプロモーター以下の転 写が誘導される  $P_{nisA}$  プロモーターによって制御されている(57)。 Western blot を 用いた発現解析では、Nisin 刺激を行った NZ-IL1Ra においてのみ顕著な rmIL-1Raの産生・分泌が確認された。このことから、本研究において Nisin 刺激依存 的に rmIL-1Ra を産生・分泌する gmLAB の構築に成功した。興味深いことに、 rmIL-1Ra の分泌量は非常に高く(2 mg/mL)、これまでに報告された同様の Nisin 誘導型遺伝子発現システム(NICE-system; Nisin Controlled gene Expression system) を使用してサイトカインの発現誘導を行う gmLAB の中で最も高いこと が分かっている (Table 1)。さらに、NZ-IL1Ra の rmIL-1Ra 分泌量が非常に高い ため、運搬体としてだけでなくエンドトキシンフリーの産生体としての利用も 期待できるだろう。rmIL-1Ra が高産生されるメカニズムは明らかではないが、 gmLAB を Microbial therapeutics として利用することを考えるときに、発現シス テムと目的タンパク質の適合性について十分に考慮する必要があることを示し ている。

次に gmLAB の産生する rmIL-1Ra に実際に IL-1Ra としての能力、すなわち、 IL-1 シグナルの阻害活性があるかどうかを調査した。rmIL-1Ra の生理活性試験 においては、IL-1R を高発現している細胞株、EL4.NOB-1 細胞を用いた。 EL4.NOB-1 細胞は IL-1 の刺激により、IL-2 を産生することが知られている(44)。 本研究においては、IL-1 $\beta$  の刺激により誘導された IL-2 の分泌レベルは NZ-IL1Ra の培養液上清より精製した rmIL-1Ra もしくは mIL-1Ra、hIL-1Ra の添加 濃度が増加するとともにその濃度依存的に減少した。これらの結果は gmLAB の産生した rmIL-1Ra が IL-1 シグナルの阻害剤として機能することを示している。また、IL-1 シグナル阻害の強さが mIL-1Ra、hIL-1Ra、精製 rmIL-1Ra の順番であったことを考慮すると、His-tag をはじめとする付加配列や開裂した  $SP_{usp45}$  が rmIL-1Ra の立体構造を変化させ、IL-1R へのアフィニティの低下を引き起こしたことが示唆された。より正確な立体構造に近づけていく為には、余

分な付加配列の除去や His-tag 等を用いないベクターの構築が求められる。

次に NZ-IL1Ra の経口投与によって rmIL-1Ra が消化管に到達するかどうかを 経口投与試験にて検証した。結果として、腸管内容物のプレーティングアッセ イでは L. lactis のコロニーを確認したとともに、盲腸及び大腸の内容物中の mIL-1Ra 濃度が有意に上昇したため、NZ-IL1Ra が生きて消化管に到達し、その 場でrmIL-1Raを分泌していることが示された。さらに、経口投与を行わなかっ た群では mIL-1Ra の血中濃度は ELISA の検出限界以下であった一方で、NZ-IL1Ra の経口投与により mIL-1Ra 濃度が劇的に増加した。タンパク質を多量に 経口投与すると、一部は分解されず消化管に到達し、そのままの形で吸収され、 血中に移行することが報告されている(58)。これらのことは、消化管に生きて 到達した gmLAB によって高分泌された rmIL-1Ra がそのまま吸収され、血中に まで移行していることを示している。そのため、NZ-IL1Raの経口投与がIL-1シ グナル阻害における有効なアプローチとなりうることが示唆された。しかし、 rmIL-1Ra の血中移行は全身での炎症抑制を誘導することが期待できる一方で、 過剰な IL-1 シグナルの阻害は重篤な副作用を引き起こすリスクもはらんでいる (35)。よって、NZ-IL1Ra の投与量の制御及び血中移行等の動態解析は実際の臨 床応用を考えた際に重要な点となるだろう。

IL-1Ra の腸管への直接的な運搬は、全身投与で引き起こされるような副作用の予防・軽減につながることが期待できるだけでなく、より効率的な抗炎症効果を引き出すことが期待できる(32)。実際、組換えhIL-1Raであるアナキンラの全身投与を行った臨床試験では、重篤な副作用を引き起こしたことが報告されている(35)。それとは対照的に、NZ-IL1Ra の経口投与であれば腸管に直接rmIL-1Raを運搬し、その場でのIL-1シグナル制御を行うことが期待できる。さらに、目的の組換えタンパク質を発現する gmLAB はそのタンパク質の精製が必要なく、培養に高度な技術を必要としないため、安価なタンパク質運搬体として機能することも魅力的な点と言えるだろう(22)。そこで、本研究では NZ-IL1Ra の抗炎症効果を、急性大腸炎モデルマウスを用いて検証した。NZ-IL1Ra の Day 0 から Day 11 までの連続的経口投与は Day 8 からの体重の増加を促進するとともに、DAI スコアの減少を示した。特に Day 5 においては NZ-IL1Ra の経口投与によって NZ-VC 経口投与群で見られるような DAI スコアの上昇が抑えられていることが示された。さらに、大腸組織切片の HE 染色では、炎症によって引き起こされる大腸の肥厚が抑制されていることが確認できた。DSS 誘導

性急性大腸炎では、DSS による腸管バリアの破壊とそれによる腸内細菌の流入により過剰な炎症が引き起こされることが分かっている(59)。また、腸管の炎症に伴いマウスの摂食量も著しく減少することで、体重減少が引き起こされる(60,61)。以上のことから、NZ-IL1Ra の経口投与によって、Day 5 までに DSS によって引き起こされる過剰な炎症が抑制されると共に、その後も引き続く IL-1シグナルを中心とした炎症反応を制御することで、急性大腸炎の悪化の抑制と改善がもたらされていることが示唆された。

DSS 誘導性大腸炎では TNF- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  といった炎症性サイトカインの過剰発 現が大腸炎の症状悪化に関与していることが知られている(45)。NZ-IL1Ra 経口 投与群においては、最終日(Day 11)における炎症性サイトカインの mRNA 発 現レベルが減少しており、NZ-IL1Raの経口投与によって過剰な炎症反応が抑制 されていることが示唆された。特に、CD4 と IL-17A によって特徴づけられる Th17 の分化は IBD において重要な役割を果たすことが知られており、Th17 の 活性化は IL-1 シグナルによって増強されることが報告されている(33,46,47)。 そこで本研究では、CD4+IL-17A+細胞のMLNにおける割合を測定した。結果と して、NZ-VC 経口投与群と比較し、CD4+ IL-17A+細胞の割合は NZ-IL1Ra 経口 投与群で減少した。このことは、NZ-IL1Ra の経口投与によって、in vivo におい てもIL-1シグナルが抑制され、Th17の増加が抑制されたことが示唆された。ま た、Shigemori らの研究においては NZ-VC が DSS 誘導性大腸炎を改善しないこ とを報告しており、これらの結果は NZ-IL1Ra が IL-1Ra を炎症部位である腸管 に運搬し、IL-1 シグナルを阻害することで、大腸炎の症状を改善したことを示 している。しかし、L. lactis が腸管に定着しないことと、シグナルを阻害するに は IL-1 の約 100 倍の IL-1Ra が必要であることを考慮すると(62, 63)、NZ-IL1Ra の予防的な投与、もしくは大腸炎誘導後の投与は効果が期待できないことが考 えられる。さらに、経口投与された NZ-IL1Ra がどのような挙動を示し、rmIL-1Ra を分泌しているかは明らかではない。例えば、既に産生した菌体内にある rmIL-1Ra を分泌しているのか、もしくは Nisin のシグナルが続き、菌体内で新 たな rmIL-1Ra が産生されているかなどさらなる調査が必要となるだろう。

IBD の病態解析の為、マウスを用いた様々な実験的大腸炎モデルマウスが作出されている一方で、ヒトにおける臨床的・病理学的な状態を十分に示すモデルは存在していない(64)。DSS 誘導性急性大腸炎モデルはその中でも期間の短さ、単純さ、そして再現性の高さから最も広く利用されているモデルである

(59)。さらに、大腸炎の急性や慢性、再発性は DSS の濃度・投与頻度で調節することが出来る点も利点として挙げられる(65)。 DSS 投与による上皮細胞の破壊とそれに引き続く腸内細菌叢の流入は結果として自然免疫を中心とした過剰な炎症を引き起こすことが分かっている(66)。そのため、マクロファージや好中球と行った免疫細胞の粘膜炎症における役割の解明を目的として、数多くの研究で利用されている(67-69)。特筆する点として、ヒトの病態と同様に DSS 誘導性急性大腸炎においても IL-1β は炎症悪化の中心的な役割を果たしており、本研究で構築した NZ-IL1Ra の抗炎症効果の検証には有用なモデルであると言える(34,70,71)。しかし、IBDが自己免疫疾患であるということに加え、DSSで引き起こされるような重篤な腸管バリアの破壊は実際の IBD では発生しない為、本モデルの使用における問題点も考慮する必要がある(66)。

炎症性免疫反応のバランスの破綻は IBD の原因の一つと考えられているが、IBD が消化管で発生する疾患であるとともに、DSS 誘導性急性大腸炎においては上皮の急激な破壊が引き起こされることから、腸内細菌叢も重要な要因として知られている(72)。そのため、in vivo 試験の最終日に盲腸内容物を回収し、盲腸内細菌叢を 16S rRNA のメタゲノム解析に基づき分析した。多様性解析においては、α 多様性(observed OTUs)及びβ多様性(bray-Curtis index)を分析した。これらの結果は、NZ-IL1Ra の経口投与によってもたらされる症状の改善は、主に IL-1 シグナルの阻害によってもたらされており、盲腸内細菌叢に影響を与えたためではないということを示唆している。しかし、本研究で実施した菌叢解析は綱レベルにとどまるものであり、多様性解析も菌叢の大きな変化しかとらえることはできない。腸内細菌叢中においては、存在割合が少なくても宿主に大きな影響を与えることができる細菌の存在を無視することはできないため、今回の菌叢解析では大腸炎の改善に腸内細菌叢の変化が全く関与していないと言い切ることはできない。この点を明らかにするためには糞便移植などのさらなる調査が必要となるだろう。

急速に西洋化の進む発展途上国における IBD 患者の急速な増加は、これまでにない IBD のパンデミックの可能性をはらんでいる(24)。既存の IBD 治療薬を用いるには、価格が高価であるということだけでなく、薬の生産及び投与に高度な技術・機器を必要とするため現実的ではない。一方で、NZ-IL1Ra の利用は、タンパク質の精製や高度な技術を必要としないだけでなく、経口での摂取が可能なため IBD に対する魅力的な次世代ツールとしての利用が期待できる。しか

し、遺伝子組み換え微生物の利用には倫理的な問題があり、環境中への排出や身体への影響など適切な管理及び調査が不可欠となる。実際、いくつかのgmLABを用いた臨床試験が行われており、生物学的封じ込めの戦略の適用や宿主への影響について調査されている。これらの試験ではgmLABの環境中への排出が抑えられていることが確認できているとともに、宿主に対しての副作用が認められないことも確認されている(73-75)。NZ-IL1Raの実装を考えたときも同様の技術を応用し、倫理的問題を考慮した上でさらなる研究を進めていく必要があるだろう。

本研究では IBD に対する新規治療戦略の提案を目的として、IL-1Ra を高分泌する gmLAB の構築に成功した。NZ-IL1Ra の経口投与は急性大腸炎における過剰な炎症反応を抑制し、症状を緩和した。これらの結果は NZ-IL1Ra が rmIL-1Ra を消化管に運搬し、IL-1 シグナルを阻害したことを示唆している。以上のことから、NZ-IL1Ra は IBD に対する魅力的な予防・軽減ツールであり、Microbial therapeutics としての利用が期待できるだろう。本研究が Microbial therapeutics 研究の一助となり、人々の健康増進に寄与できることを期待する。

### 緒言

乳酸菌はヒトをはじめとする様々な生き物の共生細菌であり、主に腸管に生息している。乳酸菌は古くから畜産物の発酵をはじめとする多くの食品製造工程で利用されており、この長い利用の歴史からアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA)より Generally Recognized As Safe (GRAS) 微生物として分類されている(76)。このことに加え、乳酸菌はプロバイオティクスとしても知られており、乳酸菌摂取による免疫調節作用や代謝促進作用などが宿主の健康維持・増進を目的として広く研究されている(77-79)。さらに、近年のバイオ医薬品の需要の高まりから、乳酸菌を疾患の予防・軽減ツールとして利用することが期待されている。特に、有用なタンパク質を産生する乳酸菌組換え体(Genetically modified lactic acid bacteria; gmLAB)は前章等でも述べたとおり、目的タンパク質の安価な産生体であるだけでなく、粘膜組織への運搬体としても利用が可能であり、Microbial therapeutics や Next-generation probiotics (NGPs)としての応用も期待されている(18, 19, 22)。実際、様々なタンパク質を発現する gmLAB が構築されており、標的とする疾患モデルを用いた前臨床試験が多く行われている(36, 40, 80, 81)。

本研究ではgmLABに産生させる目的タンパク質として、低分子抗体(single-chain fragment variable; scFv)に着目した。scFv は抗体の重鎖及び軽鎖におけるそれぞれの可変領域(variable regions of heavy; VH, variable regions of light; VL)を柔軟なペプチドリンカーで繋いだ組換えタンパク質である(82)。scFv は元の抗体と同等の抗原認識能を有していることが知られており、原核生物における組換えタンパク質発現系にて容易に産生可能であることから、抗体の代替ツールとしての利用が期待されている(83)。実際、Shigemori らは炎症性サイトカインである IL-6 に対する scFv を産生する gmLAB の構築に成功しており、産生された抗 IL-6 scFv の免疫反応性を検証している(84)。本章では、がんに対するMicrobial therapeutics 開発を目的として、cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)に対する scFv を産生する gmLAB を構築した。免疫チェックポイント分子である CTLA-4 は活性化した T 細胞表面に発現しており、T 細胞の活性化を抑制する働きがあることが知られている(85)。さらに、CTLA-4 の活性化は

抗腫瘍免疫の抑制に働くことが知られているため、この CTLA-4 に結合し、その機能を阻害するイピリムマブ (ipilimumab) は強力な抗腫瘍効果を発揮する抗体医薬として、注目されている(86,87)。抗体医薬の製造には高度な技術を必要とするだけでなく、煩雑であり時間がかかることが知られている(88)。そこで、scFv を産生する gmLAB は抗体医薬に対する魅力的な代替ツールとなるのではないかと考えた。以上のことから、イピリムマブに基づき抗ヒト CTLA-4 scFv (CTLA4scFv) をデザインすること、CTLA4scFv を産生する gmLAB を構築すること、そして産生された組換え (r) CTLA4scFv のヒト CTLA-4 分子に対する免疫反応性を検証した。

### 材料及び方法

## 1. 菌株、培養条件、及びプラスミド

本研究においては、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 (NZ9000; MoBiTec GmbH) を scFv の発現宿主としても用いた。NZ9000 は前章でも述べたとおり、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 のゲノムに NizR 及び NisK 遺伝子を挿入することで構築され、NICE-system の発現宿主として最適された乳酸菌である(57)。NZ9000 は 0.5%のグルコース(Nacalai Tesque)を含む M17 Broth (GM17) (Becton, Dickinson and Company)を用いて 30°C 条件下で静置培養した。構築した gmLAB は 10 μg/mL で chloramphenicol(Nacalai Tesque)を含む GM17 (GM17cm) にて培養した。

NICE-system 用の乳酸菌用発現ベクターとして、pNZ8148#2 を用いた。 pNZ8148#2 は NICE-system 用発現ベクターpNZ8148 (MoBiTec GmbH) を元に構築されたベクターである(89)。 pNZ8148#2 には Nisin 誘導型プロモーターである  $P_{nisA}$  を上流に持つ発現カセットがあり、乳酸菌用の複製開始点と選択マーカーである chloramphenicol の耐性遺伝子がコードされている (Fig. 9a)。

## 2. rCTLA4scFv 産生ベクターの構築

CTLA4scFv はイピリムマブの可変領域をペプチドリンカー(EGKSSGSGSESKS)で結合することで設計した。また、設計した CTLA4scFv の立体構想をタンパク質の homology-modeling Server である SWISS-MODEL (90)を用いて予測した。設計したアミノ酸配列を、L. lactis subsp. cremoris MG1363 のコドン使用頻度に基づき DNA 配列に変換した。DNA 配列の変換及び合成は Eurofins Genomics K.K. に依頼した。scFv 遺伝子配列の両端には制限酵素 BamHI 及び HindIII の認識領域が付加されており、合成遺伝子はサブクローンベクターである pEX-K4J1 にクローニングされた(accession number: LC579934)。CTLA4scFv 遺伝子配列を制限酵素処理後、pNZ8148#の MCS に挿入し、CTLA4scFv 発現ベクター(pNZ8148#2-CTLA4scFv)を構築した。構築したベクターにおける変異欠損の有無は Eurofins Genomics K.K.のシーケンス解析にて確認した。

# 3. gmLAB の構築と rCTLA4scFv の発現誘導

gmLAB の構築は前章と同様の方法にて行った。pNZ8148#2-CTLA4scFv を NZ9000 に電気穿孔法にて導入し、CTLA4scFv 産生 gmLAB(NZ-CTLA4scFv と

命名)を構築した。また、元の空ベクターである pNZ8148#2 も同様に NZ9000 に導入しベクターコントロール gmLAB(NZ-VC と命名)を構築した。それぞれの gmLAB を前培養後、終濃度が 5%となるように 2 mL の GM17cm に接種した。OD $_{600}$ =0.4 となるまで、1-1.5 hr 培養し、遺伝子発現誘導物質である Nisin(終濃度 1.25 ng/mL)を添加した後、3 hr 培養した。遠心(8000 g, 4 °C, 5 min)にて菌体を回収し、1 mL の TBS で洗浄した後、TBS+PIC に懸濁した。懸濁液をビーズ(0.2 mm $\phi$ ; ASONE)入りチューブに移し、 $\mu$ -12(TAITEC)を用いて菌体を破砕した。破砕液に 2×SDS sample buffer(Wako)を添加し、95°C、5 minで加温し、SDS 化した。

rCTLA4scF の検出は SDS-PAGE 及び mouse anti-His-tag antibody (BioLegend) を用いた Western blot にて前章と同様の方法にて行った。15%の分離ゲル、及び 濃縮ゲル(Table M2)を用いてサンプルを分離後、Amersham Hybond P PVDF membranes (GE Healthcare) に転写した。5%スキムミルク溶液にてブロッキング後、一次抗体 mouse anti-His-tag antibody (BioLegend) 及び二次抗体 (peroxidase-conjugated anti-mouse IgG [whole molecule] [Sigma-Aldrich])にて染色し、標識されたタンパク質を ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare) にて検出した。

## 4. rCTLA4scFv 発現における最適培養条件の検討

前培養した NZ-CTLA4scFv を 2 mL の GM17cm に接種し、上記と同様の方法にて、rCTLA4scFv の発現を誘導後、1、3、6、12、24、48 hr 培養した。培養後、OD $_{600}$  を測定し遠心(8000 g, 4 °C, 5 min)により、菌体及び培養液上清を回収した。回収した菌体から上記と同様の方法にて SDS 化サンプルを調製し、Western blot にて rCTLA4scFv を検出した。また、得られた 1500  $\mu$ L の培養液上清に 100%(w/v)の trichloroacetic acid(Wako)を添加し、氷上にて 3 hr 静置した。遠心(20,000 g, 4 °C, 15 min)にて沈殿物を回収し、Acetone(Nacalai Tesque)で 2回洗浄後、50  $\mu$ L の 0.05 M の NaOH(Nacalai Tesque)に溶解した。その後、等量の 2×SDS sample buffer(Wako)を添加し、95°C、5 min で加温することで SDS 化した。 菌体及び培養液上清における CTLA4scFv の分析は上記と同様の方法を用いた Western blot にて行った。

## 5. gmLAB の産生した rCTLA4scFv の免疫反応性の検証

NZ-CTLA4scFv 及び NZ-VC を 50 mL スケールの GM17cm で培養し、3 hr の発現誘導後、菌体破砕液を調製した。菌体破砕液中の総タンパク質量を BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) にて測定し、5 mg/mL に調整後以降の実験に用いた。

rCTLA4scFv の免疫反応性は以前に報告のあった ELISA を用いて検証した(84,91)。50 μL の Human CTLA-4(25 ng/mL)(ACROBiosystems, DE, USA)を 96 well plate に添加し 4°C で一晩静置することで、タンパク質を固相化した。同時にネガティブコントロールとして、タンパク質を固相化していない well も用意した。それぞれの well を 200 μL の PBS-T (PBS with 0.05% Tween 20 [Nacalai Tesque])で 3 回洗浄し、その後、100 μL の 3% bovine serum albumin(Nacalai Tesque)を添加し、2 hr 静置しブロッキングを行った。PBS-T で洗浄後、5 mg/mL に調整した NZ-CTLA4scFv 及び NZ-VC の菌体破砕液を 2 倍希釈の段階希釈を行い添加した。2 hr 後、PBS-T にて well を洗浄し、50 μL の mouse anti-His-tag antibody(1/1000)(BioLegend)を添加した。2 hr 後、PBS-T にて well を洗浄し、50 μL の peroxidase-conjugated anti-mouse IgG [whole molecule](Sigma-Aldrich)を添加し、1 hr 反応させた。PBS-T にて well を洗浄し、50 μL の 3,3,5,5-tetramethylbenzidine を添加し、15 min 静置した。2 N H<sub>2</sub>SO4 を添加し、反応を停止させた後、450 nm における吸光度を iMark microplate reader (Bio-Rad, CA, USA)を用いて測定した。

## 結果

### 1. Anti-human CTLA-4 scFv の設計

CTLA4scFv は抗ヒト CTLA-4 抗体であるイピリムマブのアミノ酸配列に基づいて設計した(86)。イピリムマブの VH 及び VL 領域をペプチドリンカー (EGKSSGSGSESKS) にて結合した (Fig. 8a, b)。さらに、設計した scFv の立体構造を SWISS-MODEL を用いて予測した (Fig. 8a)。設計した scFv のアミノ酸配列は、Eurofins Genomics K.K.によって、*L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 のコドン使用頻度に基づき、DNA 配列に変換した (Fig. 8c)。*Bam*HI と *Hind*III の制限酵素認識部位は scFv 配列の両端に付加した (Fig. 8b, c)。

## 2. rCTLA4scFv 産生 gmLAB の構築

scFv の DNA 配列を BamHI 及び HindIII の制限酵素処理を用いて pNZ8148#2 の MCS に挿入し、CTLA4scFv 産生ベクターpNZ8148#2-CTLA4scFv を構築した (Fig. 9a)。得られたベクターに変異・欠損が無いことをシーケンス解析にて確認 した。 pNZ8148#2-CTLA4scFv を電気穿孔法にて NZ9000 に導入し、CTLA4scFv 産生 gmLAB、NZ-CTLA4scFv を構築した。元のベクターである pNZ8148#2 も同様に NZ9000 に導入し、ベクターコントロール gmLAB である NZ-VC も同時に構築した。

gmLAB の培養液中に Nisin を添加することで、遺伝子発現を誘導し、anti-His tag 抗体を用いた Western blot に供することで、発現タンパク質を解析した。結果として、rCTLA4scFv のサイズに一致するバンド(29.6 kDa)を、Nisin 誘導を行った NZ-CTLA4scFv の菌体画分から検出した(Fig. 9b)。一方で、NZ-VCや Nisin 誘導を行わなかった NZ-CTLA4scFv ではバンドは確認されなかった(Fig. 9b)。これらの結果から、NZ-CTLA4scFv は Nisin の刺激依存的にrCTLA4scFv を産生していることが示された。

#### 3. rCTLA4scFv 産生における最適培養条件の検討

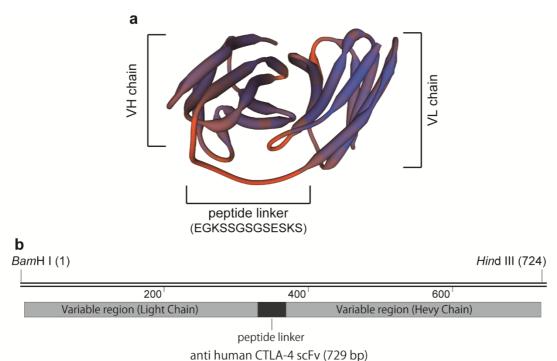
rCTLA4scFv の産生量が最大となる培養条件について検証した。NZ-CTLA4scFv を Nisin 誘導後、1、3、5、12、24、48 hr 培養し、OD600 を測定した。その後、 菌体破砕液と培養液上清を調製し、Western blot にて rCTLA4scFv を検出した。

OD<sub>600</sub> の測定結果から、NZ-CTLA4scFv は Nisin 添加後から 3 hr にかけて対数 増殖期となり、その後定常期に入ることが示された (Fig. 10a)。Western blot の

結果から、rCTLA4scFv に一致するバンドの濃さは、Nisin 添加後 3 hr で最大となり、6 hr 以降から減少した(Fig. 10b)。一方で、培養液上清においてはrCTLA4scFv のサイズに一致するバンドは見られなかったが、rCTLA4scFv の分子量よりも小さなバンドが培養開始後 24 及び 48 hr にて検出された(Fig. 10b)。

### 4. NZ-CTLA4scFv における生理活性試験

gmLAB の産生する rCTLA4scFv が実際にヒト CTLA-4 タンパク質を認識する生理活性を有するか ELISA を用いて検証した。96 well plate にヒト CTLA-4 タンパク質を添加し、一晩静置することで、タンパク質を固相化した。また、ネガティブコントロールとして何も固相化していない well も用意した。その後、NZ-CTLA4scFv もしくは NZ-VC の菌体破砕液を well に添加し、固相化したタンパク質に結合した His-tag タンパク質を抗体にて検出した。結果として、ヒトCTLA-4 タンパク質を固相化した well に NZ-CTLA4scFv の菌体破砕液を添加した場合、その濃度が上昇するに従い、吸光度も増加した(Fig. 11)。一方で、CTLA-4 タンパク質を固相化していない well に NZ-CTLA4scFv の菌体破砕液を添加した場合、もしくは NZ-VC の菌体破砕液を添加した場合、もしくは NZ-VC の菌体破砕液を添加した場合は、吸光度はベースラインのままであった(Fig. 11)。



C

# Figure 8 設計した CTLA4scFv の推定立体モデルと DNA 配列

a SWISS-MODEL を用いて推測した CTLA4scFv の立体構造。VL chain、VH chain、及びペプチドリンカーのアミノ酸配列を示す。VL chain; 軽鎖の可変領域、VH chain; 重鎖の可変領域 b 設計した CTLA4scFv における DNA 配列の模式図。数字は DNA 配列の位置を示す。c CTLA4scFv の DNA 配列。制限酵素認識部位(*Bam*HI 及び *Hind*III)は下線で示し、ペプチドリンカーの配列はグレーでハイライトした。

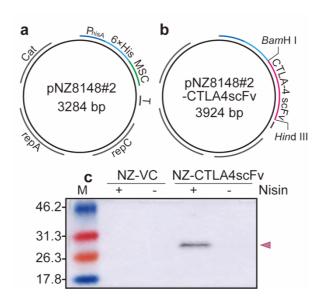


Figure 9 CTLA4scFv 発現ベクターの構築と発現解析

a, b CTLA4scFv は *Bam*HI 及び *Hin*dIII にて制限酵素処理を行い乳酸菌用ベクターである pNZ8148#2 の MCS に組込み、pNZ8148#2-CTLA4sFv を構築した。 P<sub>nisA</sub>; nisin-inducible promoter, 6× His; 6× histidine tag, MCS; multi-cloning site, T; terminator, repC and repA; origins of replication, Cat; chloramphenicol acetyltransferase. c gmLAB の発現した rCTLA4scFv の発現は anti-His tag antibody を用いた Western blot にて解析した。NZ-VC 及び NZ-CTLA4scFv を Nisin の存在/非存在下で培養し、細胞抽出液を Western blot に供した。矢頭は rCTLA4scFv のサイズに一致するバンドを示す(29.6 kDa)。 M; 分子量マーカー(kDa)。 +/-; Nisin の存在/非存在を示す。

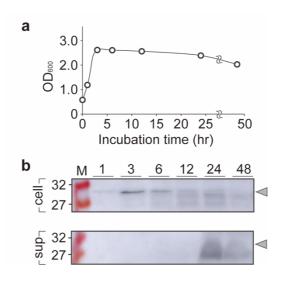


Figure 10 rCTLA4scFv 発現における最適培養時間の検討

a NZ-CTLA4scFv の生育曲線を示す。NZ-CTLA4scFv の生育はそれぞれのタイムポイントで OD600 を測定することで観察した。 b それぞれのタイムポイントにおける rCTLA4scFv の発現解析。菌体破砕液及び培養液上清中の rCTLA4scFv の発現を Western blot にて検証した。矢頭は rCTLA4scFv のサイズに一致するバンドを示す(29.6 kDa)。 M; 分子量マーカー(kDa)

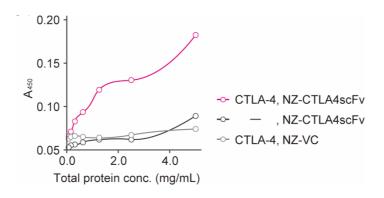


Figure 11 rCTLA4scFv の CTLA-4 タンパク質に対する免疫反応性の検証

NZ-CTLA4scFv もしくは NZ-VC の段階希釈した菌体破砕液を CTLA-4 タンパク質を固相化した 96 well plate に添加した(ピンク、グレー)。また、ネガティブコントロールとして何も固相化していない well にも添加した(黒)。その後、結合した His-tag タンパク質を抗体を用いて検出した。2 回の独立した実験を行い、そのうちの代表的なデータを示す。Pink line, CTLA-4+, NZ-CTLA4scFv; gray line, CTLA-4+, NZ-VC; Blackline, CTLA-4-, NZ-CTLA4scFv.

#### 考察

CTLA-4 は T 細胞の表面抗原である CD28 のホモログであり、CD4<sup>+</sup>及び CD8<sup>+</sup>T 細胞の両方に発現していることが知られている(92)。抗原提示細胞が発現している CD80 及び CD86 は CD28 と CTLA-4 の共通のリガンドであり、結合する受容体によって T 細胞活性化及び不活性化に作用する。CD28 と CD80/86 の結合は T 細胞の分化・増殖を誘導する一方で、CTLA-4 に結合しても、T 細胞の活性化シグナルは誘導されず、反対に T 細胞の活性化を抑制するシグナルが誘導されることが知られている(93)。また、CTLA-4 は制御性 T 細胞(Treg)を介した免疫調節にも関与しており、Treg は末梢免疫寛容に重要な役割を果たすとともに、恒常的に CTLA-4 を細胞表面に発現していることが知られている(94)。Treg表面上の CTLA-4 へのリガンド結合は、CD28 への結合に対する拮抗作用となり、エフェクターT 細胞機能の抑制及び減少を誘導する。これらの作用は Tregの免疫寛容メカニズムの一つとして知られている(95)。

上記の CTLA-4 を介した免疫寛容システムは免疫の恒常性維持においては非常に重要である一方、がん細胞はこのメカニズムを利用することで、抗腫瘍免疫からの逃避を行っていることが知られている。いくつかの研究において CTLA-4 を発現する Treg が腫瘍部位に集積していることが知られており、末梢における Treg の数も腫瘍患者において増加することが報告されている(96,97)。腫瘍微小環境では、抗腫瘍免疫として働く CD28-CD80/86 シグナルが Treg をはじめとする T細胞の CTLA-4 によって制御されているため、Treg 等の CTLA-4<sup>+</sup>T 細胞の増加は免疫反応の抑制を誘発する(92)。そのため、CTLA-4 の阻害はがん治療における標的として期待されている。実際、CTLA-4 に対する抗体医薬であるイピリムマブは広く研究されており、FDA において抗がん剤として認可を受けている(86,87,98)。しかし、抗体医薬は非常に高コストであるとともに、製造には時間や高度な技術を必要とするため、イピリムマブ利用のボトルネックとなっている(82,88)。

以上のことから、scFv は抗体医薬における魅力的な代替ツールとして利用可能ではないかと考えた。scFv は抗体の抗原認識部位を柔軟なペプチドリンカーで繋いだ低分子抗体で、抗体と同様の特異性及びアフィニティを維持している(83)。抗体に比べて構造が単純で分子量が小さい scFv は元の抗体よりも組織への浸潤性に優れているとともに、体内から短時間で除去されることが分かっている(82,99)。

より利用しやすい抗腫瘍戦略の提案を目的として、本研究ではCTLA4scFv を 産生する gmLAB の構築を行った。遺伝子発現ベクターを組込むことで、様々 なタンパク質を産生可能となった gmLAB は近年 Microbial therapeutics や NGPs に分類され、その利用が期待されている(18, 19, 22)。本研究では CTLA4scFv を イピリムマブの可変領域配列とペプチドリンカーに基づき設計した。また、こ れまでに報告のあった立体構造に基づき、アミノ酸配列の構造を予測するサー バーである SWISS-MODEL(90)を用いた立体構造予測にて、CTLA4scFv の立体 構造を予測した。分析の結果から、CTLA4scFv は VH 鎖と VL 鎖が独立して立 体構造をとり、それぞれがペプチドリンカーにて結合することが示唆された。 設計した CTLA4scFv の DNA 配列を乳酸菌用遺伝子発現ベクターに組込み、そ の後 NZ9000 に導入した。遺伝子発現解析においては NZ-CTLA4scFv 及び NZ-VCを Nisin 添加もしくは非添加培地で培養し、Western blot にて解析した。Nisin は NICE-system で利用される発現誘導物質で、前章と同様に  $P_{nisA}$  以下の遺伝子 の転写を誘導する。rCTLA4scFv の発現は Nisin 添加培地で培養した NZ-CTLA4scFv でのみ観察されたため、Nisin 刺激依存的に rCTLA4scFv を産生する gmLAB、NZ-CTLA4scFvの構築に成功した。

NZ-CTLA4scFv の rCTLA4scFv 産生における最適培養条件を検証するため、 様々な生育ステージにおける発現解析を行った。Nisin 誘導後、NZ-CTLA4scFv を 1、3、6、12、24、48 hr 培養し、菌体破砕液及び培養液上清を回収後、 rCTLA4scFv の発現を解析した。Western blot の結果から、菌体破砕液において 1、3、6、12 hr にて rCTLA4scFv のサイズに一致するバンドが見られた。バン ドの濃さは3 hrを最大とし、その後減少した。加えて、Nisin添加後12 hr以降 では rCTLA4scFv の分子量よりも小さいシグナルを検出した。これらの結果は、 対数増殖期まで rCTLA4scFv は効率的に産生されるが、その後タンパク質が分 解されていることが示唆された。NICE-system を使用した gmLAB における過去 の報告では、今回の結果と同様に対数増殖期にかけてタンパク質の産生が強く 誘導され、その後内因性のプロテアーゼによって分解されることが示されてい る(91, 100, 101)。一方で、培養液上清においては rCTLA4scFv のサイズに一致す るバンドは確認できなかったが、24、48 hr では分子量の小さいシグナルが検出 された。本章で用いた乳酸菌用遺伝子発現ベクター (pNZ8148#2) は細胞内発 現型でありタンパク質を分泌しないことを考えると、培養液上清の結果は rCTLA4scFv を産生した gmLAB が定常期において溶菌しており、内部のタンパ

ク質が放出されていることが示唆された。

標的抗原であるヒト CTLA-4 を well に固相化し、anti-His tag 抗体にて検出する ELISA にて rCTLA4scFv の生理活性を調査した。ヒト CTLA-4 を固相化した well に NZ-CTLA4scFv の菌体破砕液を添加した場合、その添加濃度依存的に吸光度が上昇し、NZ-VC の菌体破砕液や固相化していない well に NZ-CTLA4scFv の菌体破砕液を添加した場合、吸光度は上昇しなかった。これらの結果は、NZ-CTLA4scFv の菌体破砕液中に含まれる rCTLA4scFv がヒト CTLA-4 に結合することを示しており、gmLAB の産生する rCTLA4scFv に生理活性があることが示された。一方で、gmLAB の産生する rCTLA4scFv には His-tag や制限酵素認識部位を含む MCS などの付加配列があり、これらが前章で見られたような立体構造の変化を引き起こしていることが考えられる。scFv において立体構造は重要な要因である為、構築した gmLAB の産生する rCTLA4scFv の抗原認識能とイピリムマブの抗原認識能の比較は今後行っていく必要があるだろう。

がんは近年の世界的に主要な死因の一つであり、より安価で簡便な予防・軽減ツールの開発は重要な課題である(102)。加えて、世界的なバイオ医薬品の需要の高まりから、gmLABを用いた抗腫瘍ツールの開発に関する研究が行われている(103-105)。本研究で構築した NZ-CTLA4scFv のさらなる利用を考えたとき、gmLABの主な投与経路である経鼻・経口投与等を用いた前臨床試験により効果の検証は必要不可欠である。一般的なイピリムマブの投与は全身投与によって行われるが、重大な副作用が引き起こされることが分かっている(106)。一方で、経鼻や経口投与を用いた NZ-CTLA4scFv の投与は、安価な治療ツールとなるだけでなく、局所的な CTLA-4 シグナルの阻害によって副作用の軽減をもたらすことが期待できるだろう。特に、NZ-CTLA4scFv の応用として、経鼻投与を中心とした肺がんの予防軽減について、前臨床モデル等を通して検証していくことで、その有用性は証明できると考えている。

結論として、本研究では免疫反応性を有する rCTLA4scFv を産生する gmLAB の構築に成功した。rCTLA4scFv は抗ヒト CTLA-4 抗体であるイピリムマブを元に設計し、rCTLA4scFv のヒト CTLA-4 認識する生理活性は ELISA にて検証した。NZ-CTLA4scFv のさらなる利用を考えると、マウスを用いた前臨床試験の実施が必要になるだろう。NZ-CTLA4scFv が CTLA-4 シグナル制御を基盤とした抗腫瘍戦略に関する研究の一助になることを期待する。

乳酸菌はグラム陽性、細胞形態が桿菌もしくは球菌、カタラーゼ陰性、非胞子 形成等の細菌学的特徴を有する細菌で、消費したブドウ糖に対し 50%以上の乳 酸を産生することが知られている(107)。さらに、乳酸菌は広く自然界に分布し ているだけでなく、多くの動物の腸内にも生息している共生細菌であるという ことが知られている。また、乳酸菌は古くからチーズやヨーグルト、漬物をは じめとする発酵食品の製造に用いられ、その利用の長い歴史から FDA により GRAS 微生物としての認定を受けていると共に EFSA においては QPS のステー タスを与えられていることも特筆すべき点である(17, 108)。乳酸菌は安全性が 担保された微生物であると同時にそのプロバイオティクスとしての機能性も近 年注目を集めている。乳酸菌に遺伝子発現ベクターを導入することで、様々な タンパク質を産生可能となった gmLAB は従来のプロバイオティクスとしての 機能だけでなく、組換えタンパク質の産生体及び腸管粘膜への運搬体としても 利用可能である(22, 109)。特に、治療タンパク質を産生するように組換えられ た gmLAB は疾患に対する予防・軽減戦略として期待されており、プロバイオテ ィクスではなく NGPs や Microbial therapeutics に分類される(18, 19)。本研究で は、gmLABに基づく Microbial therapeutics 創出を目的として、2種類の gmLAB を構築した。

IL-1 は主要な炎症性サイトカインであり、IL-1 の引き起こす過剰な炎症反応は様々な疾患につながっている。炎症性腸疾患(IBD)における炎症部位では単球による過剰な IL-1 産生が認められており、IL-1 シグナルの阻害は IBD に対する有効な戦略となりうると考えられる。実際 IL-1 シグナルの抑制を目的として、IL-1Ra や抗 IL-1 抗体を用いた前臨床試験が行われており、その有効性が示されている。一方で、アナキンラを用いた臨床試験では重大な副作用が認められ、IL-1 シグナル阻害の難しさが明らかとなっている。そこで、IL-1Ra を全身投与ではなく、炎症部位の腸管に直接運搬することが出来ればより効果的に IL-1シグナルを阻害し疾患の予防軽減が期待できると共に、腸管にのみ多量の IL-1Ra を運搬することで、副作用の低減が期待できると考えた。gmLAB の持つ利点はこの仮説を検証する上で非常に魅力的なツールである。実際に IL-1Ra を分泌する gmLAB の経口投与はマウスの腸管に IL-1Ra を運搬すると共に、マウスの急性大腸炎の症状を緩和した。さらに、gmLAB はこれまでに報告のあった

NICE-system を用いた発現系では最も多量にサイトカインを産生した。微生物の組換えタンパク質発現系の産生能の調製は多くの研究の対象であるが、未だ完全に制御することは出来ていない。そのため、IL-1Ra が他のサイトカインよりもgmLAB にて多量に分泌されるかは明らかではなく、今後の検証が必要だろう。しかし、産生する有効成分の量はgmLABの利用における重要な要因となるため、発現宿主と発現させるタンパク質の組み合わせはMicrobial therapeutics 開発には重要となるだろう。加えて、本研究では発現宿主として L. lactis を用いているが、同乳酸菌は異種発言系のモデルとしてよく知られていると共に、前章でも述べたとおり腸管への接着性が無いことが分かっている。そのため、本研究で構築したプラスミドベクターを腸管定着性の高い乳酸菌に応用することで、異なるアプローチでの応用も可能となるだろう。

さらに、世界的な死因の一つであるがんに対する Microbial therapeutics を開発 することを目的として、免疫チェックポイント分子である CTLA-4 の機能を阻 害する CTLA4scFv を産生する gmLAB を構築した。Microbial therapeutics のよう な新たな技術が社会に実装されるには、より需要の高い分野において有効性を 示すことが重要となってくる。CTLA4scFv の元となった抗体医薬であるイピリ ムマブはそのがんに対する有効性が示される一方、副作用の大きさや、高コス トである点で課題がある。gmLAB の産生した rCTLA4scFv は CTLA-4 に対する 免疫反応性が示され、抗体医薬への代替ツールとしての利用が期待される。特 に gmLAB は経口や経鼻等の経路から投与が可能なため、この特徴を生かすた めに消化管におけるがんや肺がん等への応用を視野に入れた前臨床試験を行う 必要がある。また、今回注目した scFv は抗体を元に設計されているため、様々 な分子に対しての応用が可能である。scFv は基本的な構造が同一であり、骨格 となるアミノ酸配列は共通している。そのため、サイトカインで見られたよう な、サイトカインごとの発現量の大きな違い等が少なく、安定して gmLAB で 発現できることが期待できる。しかし、scFv は元となる抗体とは異なり、定常 領域がないため、その効果にも大きな差があることが考えられる(110)。抗体の 定常領域である Fc 領域は抗体依存性細胞傷害 (antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC) の重要な起点となる領域で、Fc 受容体を持ったマクロファ ージやナチュラルキラー細胞等が抗体と結合した細胞や異物を排除することが できる。scFv はこれらの反応が誘導されないため、抗体とはその効果に差が出 てくることが予想されるとともに、CTLA-4 を発現した正常細胞の除去が行わ れないことから副作用の低減が期待できる。scFv を用いた Microbial therapeutics の開発にはこれらの点も踏まえたさらなる研究が必要だろう。

遺伝子工学は大腸菌を主にモデル生物として利用し発展してきた。そのため、大腸菌での遺伝子発現系は乳酸菌よりもよく研究されており、乳酸菌よりも扱いやすい。さらに、大腸菌も腸内常在性の微生物であり、特に Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) はプロバイオティクスとしても知られているため、Microbial therapeutics としての研究も広く行われている(111, 112)。これらのことを考えると EcN は Microbial therapeutics 開発における非常に有効な候補であるが、乳酸菌にはやはり、これまでの利用の長い歴史から多くの人になじみがあり、社会への実装に向けた研究においては EcN よりも優れた特徴を持つ宿主であると言えるだろう。

本研究では gmLAB を用いた Microbial therapeutics の開発を目的とした研究を 行ったが、宿主として用いた Lactococcus lactis は腸管に定着しないことが分か っている(63)。一方で、乳酸菌には腸管定着性についてよく調べられたものも あり、有名な株としては Lacticaseibacillus rhamnosus GG 等が挙げられるだろう (113)。このような、腸管定着性の乳酸菌を用いれば gmLAB の幅をより広げる ことが出来る。例えば gmLAB が腸管に定着し、その場で長期にわたって治療 タンパク質を産生することが出来れば、目的タンパク質の運搬体としてだけで なく、腸管内のタンパク質産生工場として利用することが出来る(19)。結果と して、そもそもの投与回数を減らすことが期待できる。さらに、生体内の恒常 性が破綻したことを感知し、組換えタンパク質を発現するように gmLAB を設 計することで、宿主が健康な時はプロバイオティクスとして働き、疾患や病原 体に対しては Microbial therapeutics として働く様に調整することも可能である。 Mao らは Vibrio cholerae の存在を検知する gmLAB の構築を目指し、NICE-system の受容体として知られる NisK の細胞内ドメインと Vibrio cholerae のクオラムセ ンシング物質(CAI-1)と結合する CqsS ligand-binding domain の膜貫通ドメイン を融合し、CAI-1 誘導性遺伝子発現システムを構築した(114)。このシステムを 用いることで、Vibrio cholerae の分泌したクオラムセンシング物質の刺激依存的 に NICE-system が駆動しタンパク質を産生する gmLAB の構築に成功している。 一方で、腸管に gmLAB が定着する際はその排除にも考慮する必要があり、腸 内細菌叢を破壊するような抗生物質等に頼らない方法が求められる。その中で、 gmLAB の溶菌をコントロールする研究も行われており(115)、このようなシス

テムとの併用が求められるだろう。

また、Microbial therapeutics は基本的に治療タンパク質の発現を目的としてい る為、gmLABを用いることで、本研究で示した通り希少なタンパク質を精製無 しに投与可能という大きな利点がある。さらに、遺伝子工学の特徴としても挙 げられるが、人工的なタンパク質を簡単に作製できる点も gmLAB の利点の一 つと言えるだろう。実際、CTLA4scFv は本研究にて設計した人工タンパク質で あり、その有効性を示すことが出来た。さらに、scFv に留まらず複数の scFv を 組み合わせる Bispecific scFv の開発も可能である(116, 117)。加えて、本研究の 様に、単にサイトカインを発現させるのではなく、サイトカインを組み合わせ た人工タンパク質の開発も進められている。Findeisen らは2型糖尿病の新規治 療タンパク質の開発を目指し、サイトカインの IL-6 と CNTF (ciliary neurotrophic factor) の融合タンパク質を開発した(118)。IL-6 はインスリン抵抗 性に関与することが知られているサイトカインであるが(119)、その炎症誘導性 も問題視されている。しかし、同様に肥満に関与する CNTF のドメイン(120)と 組み合わせることで、炎症を惹起しない新規タンパク質、IC7を設計し、さら に体内安定性を高める Fc タンパク質(121)と融合させることで、designer cytokine である IC7Fc の構築に至っている(118)。このような人工タンパク質の 産生体としても gmLAB の特性は魅力的であり、Microbial therapeutics 開発の可 能性の大きさを感じることが出来る。

本研究のように gmLAB の有効性はマウスモデル等を用いた数多くの前臨床試験によって示されているが、gmLAB を用いた Microbial therapeutics の社会への実装を考えたとき、倫理的問題について十分に考える必要がある。まずは、gmLAB の安全性についてである。gmLAB の安全性は本研究の様な前臨床試験において示されていると共に、第一相試験においても確認されている(73)。しかし、今後さらに遺伝子組換え生物の利用を進めていく上では、新たな安全性評価の基準が必要になるだろう。そもそも、外来遺伝子を導入していることを踏まえ、NGS を用いた RNA-seq 等での発現遺伝子の網羅的な解析を行い、gmLAB使用のリスクについて議論していく必要がある。さらに、これまでの考察でも述べたとおり、gmLABの環境への排出の監視及び抑制も重要である。特に Steidler らの開発した栄養要求性 gmLAB は非常に有名である(122)。具体的には、L. lactis のゲノム上に IL-10 遺伝子を挿入する際に、チミジル酸合成酵素遺伝子の thyA と置換する形で挿入することで、gmLAB の封じ込めに成功してい

る。thyA は核酸代謝において重要な役割を果たす遺伝子であり、構築されたgmLABはチミジン要求性株となり、環境中にチミジンがない場合は生育が出来なくなってしまう。また、Gurbatri らは発現宿主自体が自己溶菌することで、細胞内の治療タンパク質を放出する Microbial therapeutics を開発した(123)。この戦略は目的タンパク質の保護と目的部位への運搬、そして封じ込め戦略の全てを達成する方法と言えるだろう。さらに、使用したベクタープラスミドの水平伝播も考慮すべき点である。通常使用される抗生物質耐性遺伝子は組換え微生物の選択マーカーとして非常に優秀ではあるが、水平伝播によって他の細菌に取り込まれることで、薬剤耐性菌を生み出してしまうリスクがある(124)。そのため、栄養要求性遺伝子を用いた選択マーカーの利用や目的遺伝子のゲノムへの組込みが必要とされている。

gmLABの開発において前臨床試験だけではなく、臨床試験での有効性の実施は必要不可欠である。実際、前臨床試験と臨床試験の間には大きな差があり、前臨床で用いられる疾患マウスモデルも実際の病態を正確に反映しているとはいえず、投与量や投与方法についても十分な検証が必要である。その中でも、IL-10 産生 gmLAB を用いた IBD 患者に対する臨床試験は、gmLAB 初の臨床試験であり、第二相試験にて十分な有効性を示せなかったが大きな前進であると言える(73,75)。さらに、口腔粘膜炎に対する gmLAB の利用における第一相試験も行われており、その安全性と許容性が示されている(125)。加えて、IL-10を産生する gmLAB に関しては現在 2 型糖尿病に対する第一相試験が進められており、2021 年 10 月に終了する予定である(NCT03751007)。このように、実用化に向けて臨床試験が進んでいるが、これらの臨床試験は主にベンチャー企業によって進められている。さらに、企業による gmLAB の実用化も視野に入れた研究も行われており(126)、このような gmLAB の Microbial therapeutics への応用に向けた急激な進歩が直近の 10 年間で見られ、FDA での gmLAB 承認が近づいていると言える。

2021 年現在は新型コロナウイルスによる感染症(COVID-19)の世界的パンデミックの只中であり、研究活動を含む社会活動の全てが多大な影響を受けている。COVID-19 によって社会の仕組みや常識が大きく変化した一方で、分子生物学の力を示す大きな機会となった。2019 年に発生した SARS-CoV-2 の全ゲノムは 2020 年の 3 月には Nature 誌にて発表され(127)、全世界の研究者に公開された。その後、世界中でワクチン開発が始まり、現在では mRNA

(BNT162b2)をベースとするワクチンが国内で既に使用されている(128)。このような作用機序のワクチンは今までは使用されておらず、パンデミックによって倫理的問題の基準が低くなると同時に科学の急激な発展の瞬間を感じることが出来る。gmLABもウイルスに対するワクチン開発のプラットフォームとしてよく使用されており、インフルエンザをはじめとする様々なウイルスに対するワクチンがこれまでに前臨床レベルで開発されている(129-133)。このような研究はまさに COVID-19 のワクチン開発の為に培われてきた基礎的知見であり、実際に SARS-CoV-2 に対するワクチンの開発も行われている(134)。ただ、このgmLABは実用化には至っておらず、さらなる開発を行う為の企業や臨床試験を行うための医療分野への十分な連携が必要不可欠だと言えるだろう。このことから、gmLAB研究をさらに発展させて行くには研究者自身の積極的な情報発信を行い、社会に研究を還元していく行動を行う必要がある。さらには、gmLABの従来のフィールドを超えた共同研究の展開も視野に入れることも重要となる。本研究が Microbial therapeutics の開発を進める一助となると共に、人々の健康維持増進に貢献出来ることを期待する。

### 参考文献

- 1. Kawamoto, S., Current Trends in Food Poisoning in Japan from 2006 to 2015. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi, **64**(1), p. 1-15. (2017)
- 2. Rodriguez, Y., M. Rojas, Y. Pacheco, Y. Acosta-Ampudia, C. Ramirez-Santana, D.M. Monsalve, M.E. Gershwin, and J.M. Anaya, Guillain-Barre syndrome, transverse myelitis and infectious diseases. *Cell Mol Immunol*, **15**(6), p. 547-562. (2018)
- 3. Napolitano, L.M., Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. *Surg Infect (Larchmt)*, **19**(2), p. 117-125. (2018)
- 4. Mohr, K.I., History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol*, **398**, p. 237-272. (2016)
- 5. Lewis, K., The Science of Antibiotic Discovery. *Cell*, **181**(1), p. 29-45. (2020)
- 6. Frieri, M., K. Kumar, and A. Boutin, Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*, **10**(4), p. 369-378. (2017)
- 7. Qian, Z., D. Zhao, Y. Yin, H. Zhu, and D. Chen, Antibacterial Activity of Lactobacillus Strains Isolated from Mongolian Yogurt against Gardnerella vaginalis. *Biomed Res Int*, **2020**, p. 3548618. (2020)
- 8. Nishiyama, K. and T. Mukai, Adhesion of Lactobacillus to Intestinal Mucin. *Methods Mol Biol*, **1887**, p. 159-166. (2019)
- 9. Amdekar, S., D. Dwivedi, P. Roy, S. Kushwah, and V. Singh, Probiotics: multifarious oral vaccine against infectious traumas. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **58**(3), p. 299-306. (2010)
- 10. Gibson, G.R., R. Hutkins, M.E. Sanders, S.L. Prescott, R.A. Reimer, S.J. Salminen, K. Scott, C. Stanton, K.S. Swanson, P.D. Cani, K. Verbeke, and G. Reid, Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **14**(8), p. 491-502. (2017)
- 11. Sen, P. and M. Oresic, Metabolic Modeling of Human Gut Microbiota on a Genome Scale: An Overview. *Metabolites*, **9**(2). (2019)
- Gill, S.R., M. Pop, R.T. Deboy, P.B. Eckburg, P.J. Turnbaugh, B.S. Samuel, J.I. Gordon, D.A. Relman, C.M. Fraser-Liggett, and K.E. Nelson, Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), p. 1355-1359. (2006)

- Milani, C., S. Duranti, F. Bottacini, E. Casey, F. Turroni, J. Mahony, C. Belzer, S. Delgado Palacio, S. Arboleya Montes, L. Mancabelli, G.A. Lugli, J.M. Rodriguez, L. Bode, W. de Vos, M. Gueimonde, A. Margolles, D. van Sinderen, and M. Ventura, The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*, 81(4). (2017)
- 14. Turnbaugh, P.J., R.E. Ley, M.A. Mahowald, V. Magrini, E.R. Mardis, and J.I. Gordon, An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**(7122), p. 1027-1031. (2006)
- 15. Mikami, A., T. Ogita, F. Namai, S. Shigemori, T. Sato, and T. Shimosato, Oral administration of Flavonifractor plautii attenuates inflammatory responses in obese adipose tissue. *Mol Biol Rep*, **47**(9), p. 6717-6725. (2020)
- Ogita, T., Y. Yamamoto, A. Mikami, S. Shigemori, T. Sato, and T. Shimosato, Oral Administration of Flavonifractor plautii Strongly Suppresses Th2 Immune Responses in Mice. *Front Immunol*, 11, p. 379. (2020)
- 17. EFSA., Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. 2:suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2015. *EFSA J*, **13**, p. 4138. (2015)
- 18. O'Toole, P.W., J.R. Marchesi, and C. Hill, Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol*, **2**, p. 17057. (2017)
- 19. Jimenez, M., R. Langer, and G. Traverso, Microbial therapeutics: New opportunities for drug delivery. *J Exp Med*, **216**(5), p. 1005-1009. (2019)
- Wang, J.W., C.H. Kuo, F.C. Kuo, Y.K. Wang, W.H. Hsu, F.J. Yu, H.M. Hu, P.I. Hsu, J.Y. Wang, and D.C. Wu, Fecal microbiota transplantation: Review and update. *J Formos Med Assoc*, 118 Suppl 1, p. S23-S31. (2019)
- 21. Garza-Gonzalez, E., S. Mendoza-Olazaran, R. Morfin-Otero, A. Ramirez-Fontes, P. Rodriguez-Zulueta, S. Flores-Trevino, P. Bocanegra-Ibarias, H. Maldonado-Garza, and A. Camacho-Ortiz, Intestinal Microbiome Changes in Fecal Microbiota Transplant (FMT) vs. FMT Enriched with Lactobacillus in the Treatment of Recurrent Clostridioides difficile Infection. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2019, p. 4549298. (2019)
- 22. Shigemori, S. and T. Shimosato, Applications of Genetically Modified

- Immunobiotics with High Immunoregulatory Capacity for Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol*, **8**, p. 22. (2017)
- 23. Schabussova, I. and U. Wiedermann, Lactic acid bacteria as novel adjuvant systems for prevention and treatment of atopic diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **8**(6), p. 557-564. (2008)
- 24. Ng, S.C., H.Y. Shi, N. Hamidi, F.E. Underwood, W. Tang, E.I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, J.C.Y. Wu, F.K.L. Chan, J.J.Y. Sung, and G.G. Kaplan, Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), p. 2769-2778. (2017)
- 25. Sairenji, T., K.L. Collins, and D.V. Evans, An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Prim Care*, **44**(4), p. 673-692. (2017)
- 26. Ludwiczek, O., E. Vannier, I. Borggraefe, A. Kaser, B. Siegmund, C.A. Dinarello, and H. Tilg, Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, **138**(2), p. 323-329. (2004)
- 27. Mahida, Y.R., K. Wu, and D.P. Jewell, Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut*, **30**(6), p. 835-838. (1989)
- 28. Yazdi, A.S. and K. Ghoreschi, The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol*, **941**, p. 21-29. (2016)
- 29. Harrell, C.R., B.S. Markovic, C. Fellabaum, N. Arsenijevic, V. Djonov, and V. Volarevic, The role of Interleukin 1 receptor antagonist in mesenchymal stem cellbased tissue repair and regeneration. *Biofactors*, **46**(2), p. 263-275. (2020)
- Casini-Raggi, V., L. Kam, Y.J. Chong, C. Fiocchi, T.T. Pizarro, and F. Cominelli, Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol*, 154(5), p. 2434-2440. (1995)
- 31. Dosh, R.H., N. Jordan-Mahy, C. Sammon, and C. Le Maitre, Interleukin 1 is a key driver of inflammatory bowel disease-demonstration in a murine IL-1Ra knockout model. *Oncotarget*, **10**(37), p. 3559-3575. (2019)
- 32. Cao, J., J. Cheng, S. Xi, X. Qi, S. Shen, and Y. Ge, Alginate/chitosan microcapsules for in-situ delivery of the protein, interleukin-1 receptor antagonist

- (IL-1Ra), for the treatment of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in a mouse model. *Eur J Pharm Biopharm*, **137**, p. 112-121. (2019)
- 33. Coccia, M., O.J. Harrison, C. Schiering, M.J. Asquith, B. Becher, F. Powrie, and K.J. Maloy, IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med*, **209**(9), p. 1595-1609. (2012)
- 34. Siegmund, B., H.A. Lehr, G. Fantuzzi, and C.A. Dinarello, IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**(23), p. 13249-13254. (2001)
- 35. Cabral, V.P., C.A. Andrade, S.R. Passos, M.F. Martins, and Y.H. Hokerberg, Severe infection in patients with rheumatoid arthritis taking anakinra, rituximab, or abatacept: a systematic review of observational studies. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*, **56**(6), p. 543-550. (2016)
- 36. Hanson, M.L., J.A. Hixon, W. Li, B.K. Felber, M.R. Anver, C.A. Stewart, B.M. Janelsins, S.K. Datta, W. Shen, M.H. McLean, and S.K. Durum, Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice. *Gastroenterology*, **146**(1), p. 210-221.e213. (2014)
- 37. Huibregtse, I.L., V. Snoeck, A. de Creus, H. Braat, E.C. De Jong, S.J. Van Deventer, and P. Rottiers, Induction of ovalbumin-specific tolerance by oral administration of Lactococcus lactis secreting ovalbumin. *Gastroenterology*, **133**(2), p. 517-528. (2007)
- 38. Shigemori, S., K. Oshiro, P. Wang, Y. Yamamoto, Y. Wang, T. Sato, Y. Uyeno, and T. Shimosato, Generation of dipeptidyl peptidase-IV-inhibiting peptides from β-lactoglobulin secreted by Lactococcus lactis. *Biomed Res Int*, **2014**, p. 393598. (2014)
- 39. Hung, J.H. and Z. Weng, Sequence Alignment and Homology Search with BLAST and ClustalW. *Cold Spring Harb Protoc*, **2016**(11). (2016)
- 40. Shigemori, S., T. Watanabe, K. Kudoh, M. Ihara, S. Nigar, Y. Yamamoto, Y. Suda, T. Sato, H. Kitazawa, and T. Shimosato, Oral delivery of Lactococcus lactis that secretes bioactive heme oxygenase-1 alleviates development of acute colitis in mice. *Microb Cell Fact*, 14, p. 189. (2015)
- 41. Rio, D.C., M. Ares, Jr., G.J. Hannon, and T.W. Nilsen, Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*, **2010**(6), p. pdb prot5439. (2010)

- 42. Callahan, B.J., P.J. McMurdie, M.J. Rosen, A.W. Han, A.J. Johnson, and S.P. Holmes, DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*, **13**(7), p. 581-583. (2016)
- 43. Bolyen, E., J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H. Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J.E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C.J. Brislawn, C.T. Brown, B.J. Callahan, A.M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E.K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P.C. Dorrestein, G.M. Douglas, D.M. Durall, C. Duvallet, C.F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J.M. Gauglitz, S.M. Gibbons, D.L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G.A. Huttley, S. Janssen, A.K. Jarmusch, L. Jiang, B.D. Kaehler, K.B. Kang, C.R. Keefe, P. Keim, S.T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciolek, J. Kreps, M.G.I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.-X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B.D. Martin, D. McDonald, L.J. McIver, A.V. Melnik, J.L. Metcalf, S.C. Morgan, J.T. Morton, A.T. Naimey, J.A. Navas-Molina, L.F. Nothias, S.B. Orchanian, T. Pearson, S.L. Peoples, D. Petras, M.L. Preuss, E. Pruesse, L.B. Rasmussen, A. Rivers, M.S. Robeson, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S.J. Song, J.R. Spear, A.D. Swafford, L.R. Thompson, P.J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P.J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J.J.J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K.C. Weber, C.H.D. Williamson, A.D. Willis, Z.Z. Xu, J.R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight and J.G. Caporaso, Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnology, 37(8), p. 852-857. (2019)
- 44. Gresnigt, M.S., S. Bozza, K.L. Becker, L.A. Joosten, S. Abdollahi-Roodsaz, W.B. van der Berg, C.A. Dinarello, M.G. Netea, T. Fontaine, A. De Luca, S. Moretti, L. Romani, J.P. Latge, and F.L. van de Veerdonk, A polysaccharide virulence factor from Aspergillus fumigatus elicits anti-inflammatory effects through induction of Interleukin-1 receptor antagonist. *PLoS Pathog*, 10(3), p. e1003936. (2014)
- 45. Chassaing, B., J.D. Aitken, M. Malleshappa, and M. Vijay-Kumar, Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, **104**, p. Unit 15 25. (2014)
- 46. Ikeda, S., S. Saijo, M.A. Murayama, K. Shimizu, A. Akitsu, and Y. Iwakura,

- Excess IL-1 signaling enhances the development of Th17 cells by downregulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *J Immunol*, **192**(4), p. 1449-1458. (2014)
- Mailer, R.K., A.L. Joly, S. Liu, S. Elias, J. Tegner, and J. Andersson, IL-1beta promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Sci Rep*,
  5, p. 14674. (2015)
- 48. Sha, Y. and S. Markovic-Plese, A role of IL-1R1 signaling in the differentiation of Th17 cells and the development of autoimmune diseases. *Self Nonself*, **2**(1), p. 35-42. (2011)
- 49. Fernandez, A., J.M. Rodriguez, R.J. Bongaerts, M.J. Gasson, and N. Horn, Nisin-controlled extracellular production of interleukin-2 in Lactococcus lactis strains, without the requirement for a signal peptide sequence. *Appl Environ Microbiol*, **73**(23), p. 7781-7784. (2007)
- 50. Avall-Jaaskelainen, S. and A. Palva, Secretion of biologically active porcine interleukin-2 by Lactococcus lactis. *Vet Microbiol*, **115**(1-3), p. 278-283. (2006)
- 51. Bermudez-Humaran, L.G., J.P. Motta, C. Aubry, P. Kharrat, L. Rous-Martin, J.M. Sallenave, C. Deraison, N. Vergnolle, and P. Langella, Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and TGF-beta anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb Cell Fact*, **14**, p. 26. (2015)
- 52. Fernandez, A., N. Horn, U. Wegmann, C. Nicoletti, M.J. Gasson, and A. Narbad, Enhanced secretion of biologically active murine interleukin-12 by Lactococcus lactis. *Appl Environ Microbiol*, **75**(3), p. 869-871. (2009)
- 53. Bermudez-Humaran, L.G., P. Langella, N.G. Cortes-Perez, A. Gruss, R.S. Tamez-Guerra, S.C. Oliveira, O. Saucedo-Cardenas, R. Montes de Oca-Luna, and Y. Le Loir, Intranasal immunization with recombinant Lactococcus lactis secreting murine interleukin-12 enhances antigen-specific Th1 cytokine production. *Infect Immun*, **71**(4), p. 1887-1896. (2003)
- 54. Feizollahzadeh, S., H. Khanahmad, I. Rahimmanesh, M. Ganjalikhani-Hakemi, A. Andalib, M.H. Sanei, and A. Rezaei, Expression of biologically active murine interleukin-18 in Lactococcus lactis. *FEMS Microbiol Lett*, **363**(21). (2016)
- 55. Loera-Arias, M.J., J. Villatoro-Hernandez, M.A. Parga-Castillo, A. Salcido-Montenegro, O. Barboza-Quintana, G.E. Munoz-Maldonado, R. Montes-de-Oca-Luna, and O. Saucedo-Cardenas, Secretion of biologically active human

- interleukin 22 (IL-22) by Lactococcus lactis. *Biotechnol Lett*, **36**(12), p. 2489-2494. (2014)
- 56. Wang, J., M. Tian, W. Li, and F. Hao, Preventative delivery of IL-35 by Lactococcus lactis ameliorates DSS-induced colitis in mice. *Appl Microbiol Biotechnol*, **103**(19), p. 7931-7941. (2019)
- 57. Mierau, I. and M. Kleerebezem, 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in Lactococcus lactis. *Appl Microbiol Biotechnol*, **68**(6), p. 705-717. (2005)
- 58. Mizokami, A., Y. Yasutake, J. Gao, M. Matsuda, I. Takahashi, H. Takeuchi, and M. Hirata, Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. *PLoS One*, **8**(2), p. e57375. (2013)
- 59. Eichele, D.D. and K.K. Kharbanda, Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*, **23**(33), p. 6016-6029. (2017)
- 60. Ye, Z., C.O. Hong, K. Lee, J. Hostetter, M. Wannemuehler, and S. Hendrich, Plasma caffeic acid is associated with statistical clustering of the anticolitic efficacy of caffeic acid in dextran sulfate sodium-treated mice. *J Nutr*, **141**(11), p. 1989-1995. (2011)
- 61. DeBoer, M.D., Y. Li, and S. Cohn, Colitis causes delay in puberty in female mice out of proportion to changes in leptin and corticosterone. *J Gastroenterol*, **45**(3), p. 277-284. (2010)
- 62. Arend, W.P., H.G. Welgus, R.C. Thompson, and S.P. Eisenberg, Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J Clin Invest*, **85**(5), p. 1694-1697. (1990)
- 63. Kimoto, H., M. Nomura, M. Kobayashi, K. Mizumachi, and T. Okamoto, Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. *Canadian Journal of Microbiology*, **49**(11), p. 707-711. (2003)
- 64. Randhawa, P.K., K. Singh, N. Singh, and A.S. Jaggi, A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J Physiol Pharmacol*, **18**(4), p. 279-288. (2014)
- 65. Chassaing, B., J.D. Aitken, M. Malleshappa, and M. Vijay-Kumar, Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol*, **104**, p. 15 25 11-15 25 14. (2014)

- 66. Kiesler, P., I.J. Fuss, and W. Strober, Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, **1**(2), p. 154-170. (2015)
- 67. Dieleman, L.A., B.U. Ridwan, G.S. Tennyson, K.W. Beagley, R.P. Bucy, and C.O. Elson, Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology*, 107(6), p. 1643-1652. (1994)
- 68. Pull, S.L., J.M. Doherty, J.C. Mills, J.I. Gordon, and T.S. Stappenbeck, Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(1), p. 99-104. (2005)
- 69. Chami, B., A.W. Yeung, C. van Vreden, N.J. King, and S. Bao, The role of CXCR3 in DSS-induced colitis. *PLoS One*, **9**(7), p. e101622. (2014)
- 70. Bersudsky, M., L. Luski, D. Fishman, R.M. White, N. Ziv-Sokolovskaya, S. Dotan, P. Rider, I. Kaplanov, T. Aychek, C.A. Dinarello, R.N. Apte, and E. Voronov, Non-redundant properties of IL-1alpha and IL-1beta during acute colon inflammation in mice. *Gut*, **63**(4), p. 598-609. (2014)
- 71. Maeda, S., L.C. Hsu, H. Liu, L.A. Bankston, M. Iimura, M.F. Kagnoff, L. Eckmann, and M. Karin, Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science*, **307**(5710), p. 734-738. (2005)
- 72. Ni, J., G.D. Wu, L. Albenberg, and V.T. Tomov, Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **14**(10), p. 573-584. (2017)
- 73. Braat, H., P. Rottiers, D.W. Hommes, N. Huyghebaert, E. Remaut, J.P. Remon, S.J. van Deventer, S. Neirynck, M.P. Peppelenbosch, and L. Steidler, A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **4**(6), p. 754-759. (2006)
- 74. Caluwaerts, S., K. Vandenbroucke, L. Steidler, S. Neirynck, P. Vanhoenacker, S. Corveleyn, B. Watkins, S. Sonis, B. Coulie, and P. Rottiers, AG013, a mouth rinse formulation of Lactococcus lactis secreting human Trefoil Factor 1, provides a safe and efficacious therapeutic tool for treating oral mucositis. *Oral Oncol*, **46**(7), p. 564-570. (2010)
- 75. Vermeire, S., P.J. Rutgeerts, G.R. D'Haens, M. De Vos, B. Bressler, A. Van der Aa, B. Coulie, C.J. Wong, and B.G. Feagan, 46 A Phase 2a Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Multi-Center Dose Escalation Study to Evaluate the

- Safety, Tolerability, Pharmacodynamics and Efficacy of AG011 in Patients With Moderately Active Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, **138**(5), p. S-9. (2010)
- 76. Food, A. Organization, and W.H. Organization, *Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. 2006: FAO.
- 77. Hill, C., F. Guarner, G. Reid, G.R. Gibson, D.J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, R.B. Canani, H.J. Flint, S. Salminen, P.C. Calder, and M.E. Sanders, Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, **11**(8), p. 506-514. (2014)
- Vallianou, N., T. Stratigou, G.S. Christodoulatos, C. Tsigalou, and M. Dalamaga,
   Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Postbiotics, and Obesity: Current Evidence,
   Controversies, and Perspectives. *Curr Obes Rep.* (2020)
- 79. Yousefi, B., M. Eslami, A. Ghasemian, P. Kokhaei, A. Salek Farrokhi, and N. Darabi, Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *J Cell Physiol*, **234**(6), p. 8008-8018. (2019)
- 80. McLean, M.H., C. Andrews, M.L. Hanson, W.A. Baseler, M.R. Anver, E. Senkevitch, A.K. Staniszewska, C. Smith, L.C. Davies, J. Hixon, W. Li, W. Shen, L. Steidler, and S.K. Durum, Interleukin-27 Is a Potential Rescue Therapy for Acute Severe Colitis Through Interleukin-10-Dependent, T-Cell-Independent Attenuation of Colonic Mucosal Innate Immune Responses. *Inflamm Bowel Dis*, 23(11), p. 1983-1995. (2017)
- 81. Steidler, L., W. Hans, L. Schotte, S. Neirynck, F. Obermeier, W. Falk, W. Fiers, and E. Remaut, Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10. *Science*, **289**(5483), p. 1352-1355. (2000)
- 82. Ahmad, Z.A., S.K. Yeap, A.M. Ali, W.Y. Ho, N.B. Alitheen, and M. Hamid, scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*, **2012**, p. 980250. (2012)
- 83. Bird, R.E., K.D. Hardman, J.W. Jacobson, S. Johnson, B.M. Kaufman, S.M. Lee, T. Lee, S.H. Pope, G.S. Riordan, and M. Whitlow, Single-chain antigen-binding proteins. *Science*, **242**(4877), p. 423-426. (1988)
- 84. Shigemori, S., M. Ihara, T. Sato, Y. Yamamoto, S. Nigar, T. Ogita, and T. Shimosato, Secretion of an immunoreactive single-chain variable fragment antibody against mouse interleukin 6 by Lactococcus lactis. *Appl Microbiol*

- Biotechnol, **101**(1), p. 341-349. (2017)
- Walunas, T.L., D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, and J.A. Bluestone, CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, **1**(5), p. 405-413. (1994)
- 86. Graziani, G., L. Tentori, and P. Navarra, Ipilimumab: a novel immunostimulatory monoclonal antibody for the treatment of cancer. *Pharmacol Res*, **65**(1), p. 9-22. (2012)
- 87. Ribas, A. and J.D. Wolchok, Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, **359**(6382), p. 1350-1355. (2018)
- 88. Samaranayake, H., T. Wirth, D. Schenkwein, J.K. Raty, and S. Yla-Herttuala, Challenges in monoclonal antibody-based therapies. *Ann Med*, **41**(5), p. 322-331. (2009)
- 89. Shigemori, S., S. Yonekura, T. Sato, M. Nakanishi, H. Otani, and T. Shimosato, Expression of a biologically active GFP-α(S1)-casein fusion protein in Lactococcus lactis. *Curr Microbiol*, **64**(6), p. 569-575. (2012)
- 90. Schwede, T., J. Kopp, N. Guex, and M.C. Peitsch, SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, **31**(13), p. 3381-3385. (2003)
- 91. Namai, F., S. Shigemori, T. Ogita, T. Sato, and T. Shimosato, Construction of genetically modified Lactococcus lactis that produces bioactive anti-interleukin-4 single-chain fragment variable. *Mol Biol Rep*, **47**(9), p. 7039-7047. (2020)
- 92. Rowshanravan, B., N. Halliday, and D.M. Sansom, CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*, **131**(1), p. 58-67. (2018)
- 93. Buchbinder, E.I. and A. Desai, CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*, **39**(1), p. 98-106. (2016)
- 94. Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi, Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*, **192**(2), p. 303-310. (2000)
- 95. Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi, CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, **322**(5899), p. 271-275. (2008)

- 96. Ondondo, B., E. Jones, A. Godkin, and A. Gallimore, Home sweet home: the tumor microenvironment as a haven for regulatory T cells. *Front Immunol*, **4**, p. 197. (2013)
- 97. Whiteside, T.L., What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol*, **22**(4), p. 327-334. (2012)
- 98. Boutros, C., A. Tarhini, E. Routier, O. Lambotte, F.L. Ladurie, F. Carbonnel, H. Izzeddine, A. Marabelle, S. Champiat, A. Berdelou, E. Lanoy, M. Texier, C. Libenciuc, A.M. Eggermont, J.C. Soria, C. Mateus, and C. Robert, Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination. *Nat Rev Clin Oncol*, **13**(8), p. 473-486. (2016)
- 99. Vaks, L. and I. Benhar, Production of stabilized scFv antibody fragments in the E. coli bacterial cytoplasm. *Methods Mol Biol*, **1060**, p. 171-184. (2014)
- 100. de Ruyter, P.G., O.P. Kuipers, and W.M. de Vos, Controlled gene expression systems for Lactococcus lactis with the food-grade inducer nisin. *Appl Environ Microbiol*, **62**(10), p. 3662-3667. (1996)
- 101. Kuipers, O.P., P.G. de Ruyter, M. Kleerebezem, and W.M. de Vos, Controlled overproduction of proteins by lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol*, **15**(4), p. 135-140. (1997)
- 102. Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, and A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, **68**(6), p. 394-424. (2018)
- 103. Ciacma, K., J. Wieckiewicz, S. Kedracka-Krok, M. Kurtyka, M. Stec, M. Siedlar, and J. Baran, Secretion of tumoricidal human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by recombinant Lactococcus lactis: optimization of in vitro synthesis conditions. *Microb Cell Fact*, **17**(1), p. 177. (2018)
- 104. de Moreno de LeBlanc, A., J.G. LeBlanc, G. Perdigon, A. Miyoshi, P. Langella, V. Azevedo, and F. Sesma, Oral administration of a catalase-producing Lactococcus lactis can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *J Med Microbiol*, 57(Pt 1), p. 100-105. (2008)
- Jacouton, E., E. Torres Maravilla, A.S. Boucard, N. Pouderous, A.P. Pessoa Vilela,I. Naas, F. Chain, V. Azevedo, P. Langella, and L.G. Bermudez-Humaran, Anti-

- tumoral Effects of Recombinant Lactococcus lactis Strain Secreting IL-17A Cytokine. *Front Microbiol*, **9**, p. 3355. (2018)
- 106. Hryniewicki, A.T., C. Wang, R.A. Shatsky, and C.J. Coyne, Management of Immune Checkpoint Inhibitor Toxicities: A Review and Clinical Guideline for Emergency Physicians. *J Emerg Med*, 55(4), p. 489-502. (2018)
- 107. 上野川修一, 乳酸菌の保険機能と応用. 2007, シーエムシー.
- 108. Adams, M.R., Safety of industrial lactic acid bacteria. *J Biotechnol*, **68**(2-3), p. 171-178. (1999)
- 109. Wells, J., Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol*, **2**, p. 423-445. (2011)
- 110. Repp, R., C. Kellner, A. Muskulus, M. Staudinger, S.M. Nodehi, P. Glorius, D. Akramiene, M. Dechant, G.H. Fey, P.H. van Berkel, J.G. van de Winkel, P.W. Parren, T. Valerius, M. Gramatzki, and M. Peipp, Combined Fc-protein- and Fc-glyco-engineering of scFv-Fc fusion proteins synergistically enhances CD16a binding but does not further enhance NK-cell mediated ADCC. *J Immunol Methods*, 373(1-2), p. 67-78. (2011)
- 111. Sonnenborn, U., Escherichia coli strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: history of a special Escherichia coli strain with probiotic properties. *FEMS Microbiol Lett*, **363**(19). (2016)
- 112. Yu, X., C. Lin, J. Yu, Q. Qi, and Q. Wang, Bioengineered Escherichia coli Nissle 1917 for tumour-targeting therapy. *Microb Biotechnol*, **13**(3), p. 629-636. (2020)
- 113. Capurso, L., Thirty Years of Lactobacillus rhamnosus GG: A Review. *J Clin Gastroenterol*, **53 Suppl 1**, p. S1-S41. (2019)
- 114. Mao, N., A. Cubillos-Ruiz, D.E. Cameron, and J.J. Collins, Probiotic strains detect and suppress cholera in mice. *Sci Transl Med*, **10**(445). (2018)
- Hickey, R.M., R.P. Ross, and C. Hill, Controlled autolysis and enzyme release in a recombinant lactococcal strain expressing the metalloendopeptidase enterolysin A. *Appl Environ Microbiol*, 70(3), p. 1744-1748. (2004)
- 116. Cao, M., C. Wang, W.K. Chung, D. Motabar, J. Wang, E. Christian, S. Lin, A. Hunter, X. Wang, and D. Liu, Characterization and analysis of scFv-IgG bispecific antibody size variants. *MAbs*, **10**(8), p. 1236-1247. (2018)
- 117. Wang, Q., Y. Chen, J. Park, X. Liu, Y. Hu, T. Wang, K. McFarland, and M.J. Betenbaugh, Design and Production of Bispecific Antibodies. *Antibodies (Basel)*,

- **8**(3). (2019)
- Findeisen, M., T.L. Allen, D.C. Henstridge, H. Kammoun, A.E. Brandon, L.L. Baggio, K.I. Watt, M. Pal, L. Cron, E. Estevez, C. Yang, G.M. Kowalski, L. O'Reilly, C. Egan, E. Sun, L.M. Thai, G. Krippner, T.E. Adams, R.S. Lee, J. Grotzinger, C. Garbers, S. Risis, M.J. Kraakman, N.A. Mellet, J. Sligar, E.T. Kimber, R.L. Young, M.A. Cowley, C.R. Bruce, P.J. Meikle, P.A. Baldock, P. Gregorevic, T.J. Biden, G.J. Cooney, D.J. Keating, D.J. Drucker, S. Rose-John, and M.A. Febbraio, Treatment of type 2 diabetes with the designer cytokine IC7Fc. *Nature*, 574(7776), p. 63-68. (2019)
- Matthews, V.B., T.L. Allen, S. Risis, M.H. Chan, D.C. Henstridge, N. Watson, L.A. Zaffino, J.R. Babb, J. Boon, P.J. Meikle, J.B. Jowett, M.J. Watt, J.O. Jansson, C.R. Bruce, and M.A. Febbraio, Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia*, 53(11), p. 2431-2441. (2010)
- 120. Watt, M.J., N. Dzamko, W.G. Thomas, S. Rose-John, M. Ernst, D. Carling, B.E. Kemp, M.A. Febbraio, and G.R. Steinberg, CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med*, 12(5), p. 541-548. (2006)
- 121. Jazayeri, J.A. and G.J. Carroll, Fc-based cytokines: prospects for engineering superior therapeutics. *BioDrugs*, **22**(1), p. 11-26. (2008)
- 122. Steidler, L., S. Neirynck, N. Huyghebaert, V. Snoeck, A. Vermeire, B. Goddeeris, E. Cox, J.P. Remon, and E. Remaut, Biological containment of genetically modified Lactococcus lactis for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol*, 21(7), p. 785-789. (2003)
- 123. Gurbatri, C.R., I. Lia, R. Vincent, C. Coker, S. Castro, P.M. Treuting, T.E. Hinchliffe, N. Arpaia, and T. Danino, Engineered probiotics for local tumor delivery of checkpoint blockade nanobodies. *Sci Transl Med*, 12(530). (2020)
- 124. Sieow, B.F., K.S. Wun, W.P. Yong, I.Y. Hwang, and M.W. Chang, Tweak to Treat: Reprograming Bacteria for Cancer Treatment. *Trends Cancer*, **7**(5), p. 447-464. (2021)
- 125. Limaye, S.A., R.I. Haddad, F. Cilli, S.T. Sonis, A.D. Colevas, M.T. Brennan, K.S. Hu, and B.A. Murphy, Phase 1b, multicenter, single blinded, placebo-controlled, sequential dose escalation study to assess the safety and tolerability of topically

- applied AG013 in subjects with locally advanced head and neck cancer receiving induction chemotherapy. *Cancer*, **119**(24), p. 4268-4276. (2013)
- 126. Leventhal, D.S., A. Sokolovska, N. Li, C. Plescia, S.A. Kolodziej, C.W. Gallant, R. Christmas, J.R. Gao, M.J. James, A. Abin-Fuentes, M. Momin, C. Bergeron, A. Fisher, P.F. Miller, K.A. West, and J.M. Lora, Immunotherapy with engineered bacteria by targeting the STING pathway for anti-tumor immunity. *Nat Commun*, 11(1), p. 2739. (2020)
- 127. Wu, F., S. Zhao, B. Yu, Y.M. Chen, W. Wang, Z.G. Song, Y. Hu, Z.W. Tao, J.H. Tian, Y.Y. Pei, M.L. Yuan, Y.L. Zhang, F.H. Dai, Y. Liu, Q.M. Wang, J.J. Zheng, L. Xu, E.C. Holmes, and Y.Z. Zhang, A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, **579**(7798), p. 265-269. (2020)
- 128. Walsh, E.E., R.W. Frenck, Jr., A.R. Falsey, N. Kitchin, J. Absalon, A. Gurtman, S. Lockhart, K. Neuzil, M.J. Mulligan, R. Bailey, K.A. Swanson, P. Li, K. Koury, W. Kalina, D. Cooper, C. Fontes-Garfias, P.Y. Shi, O. Tureci, K.R. Tompkins, K.E. Lyke, V. Raabe, P.R. Dormitzer, K.U. Jansen, U. Sahin, and W.C. Gruber, Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates. N Engl J Med, 383(25), p. 2439-2450. (2020)
- 129. Lei, H., X. Peng, D. Zhao, H. Jiao, and J. Ouyang, Cross-protection of Lactococcus lactis-displayed HA2 subunit against homologous and heterologous influenza A viruses in mice. *Arch Virol*, **160**(12), p. 3011-3019. (2015)
- 130. Guo, M., S. Yi, Y. Guo, S. Zhang, J. Niu, K. Wang, and G. Hu, Construction of a Recombinant Lactococcus lactis Strain Expressing a Variant Porcine Epidemic Diarrhea Virus S1 Gene and Its Immunogenicity Analysis in Mice. *Viral Immunol*, 32(3), p. 144-150. (2019)
- 131. Naderi-Samani, M., M. Soltani, M. Dadar, A. Taheri-Mirghaed, A. Zargar, S. Ahmadivand, R. Hassanzadeh, and L.M. Goudarzi, Oral immunization of trout fry with recombinant Lactococcus lactis NZ3900 expressing G gene of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV). Fish Shellfish Immunol, 105, p. 62-70. (2020)
- 132. Song, S., P. Li, R. Zhang, J. Chen, J. Lan, S. Lin, G. Guo, Z. Xie, and S. Jiang, Oral vaccine of recombinant Lactococcus lactis expressing the VP1 protein of duck hepatitis A virus type 3 induces mucosal and systemic immune responses. *Vaccine*, **37**(31), p. 4364-4369. (2019)

- 133. Liu, X., L. Qi, J. Lv, Z. Zhang, P. Zhou, Z. Ma, Y. Wang, Y. Zhang, and L. Pan, The immune response to a recombinant Lactococcus lactis oral vaccine against foot-and-mouth disease virus in mice. *Biotechnol Lett*, **42**(10), p. 1907-1917. (2020)
- 134. Wang, M., T. Fu, J. Hao, L. Li, M. Tian, N. Jin, L. Ren, and C. Li, A recombinant Lactobacillus plantarum strain expressing the spike protein of SARS-CoV-2. *Int J Biol Macromol*, **160**, p. 736-740. (2020)

#### 謝辞

本論文は筆者が信州大学大学院総合医理工学研究科総合理工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まとめたものです。本学学術研究院(農学系)下里剛士教授には指導教員として本研究を実施する機会を与えていただき、その遂行において学術面、技術面そして精神面ともに多大なる御指導、御助言を頂きました。ここに深謝の意を表します。また、副査として本論文を御精査頂き、貴重なコメントの数々を賜りました本学学術研究院(農学系)真壁秀文教授、学術研究院(農学系)米倉真一教授、東北大学大学院農学研究科北澤春樹教授、本学学術研究院(農学系)高谷智英助教に深く感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、医学的視点から数々の有益な御助言、御指導を頂きました本学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所佐藤隆特任教授に深謝申し上げます。数々の御助力、御指導を頂いた本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、重盛駿助教に深謝いたします。また、お世話になりました分子生命工学研究室の皆様に心より感謝申し上げます。最後に、研究遂行にあたり様々な面で支援していただいた農学部中原寮の皆さまに感謝いたします。本当にありがとうございました。

令和3年9月6日生井楓

## 発表論文

1.

Fu Namai, Suguru Shigemori, Tasuku Ogita, Takashi Sato, Takeshi Shimosato, Microbial therapeutics for acute colitis based on genetically modified *Lactococcus lactis* hypersecreting IL-1Ra in mice. *Exp Mol Med.*, 52, 1627–1636 (2020). https://doi.org/10.1038/s12276-020-00507-5

2.

Fu Namai, Aito Murakami, Asami Ueda, Masami Tsukagoshi, Suguru Shigemori, Tasuku Ogita, Takashi Sato, Takeshi Shimosato, Construction of Genetically Modified *Lactococcus lactis* Producing Anti-human-CTLA-4 Single-Chain Fragment Variable. *Mol Biotechnol.*, 62, 572–579 (2020). https://doi.org/10.1007/s12033-020-00274-8