

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20267

研究課題名(和文) ヒト鼻粘膜を介した新規drug delivery systemの構築

研究課題名(英文) Construction of a novel drug delivery system across the human nasal mucosa

研究代表者

矢島 諒人 (YAJIMA, RYOTO)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90722455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの鼻粘膜はタイト結合を介して連続したバリアを形成する。タイト結合によって調節される傍細胞経路は、鼻粘膜を介した鼻腔内投与において重要である。C-CPE変異体のC-CPE194、C-CPEm19は細胞傷害なくタイト結合バリアを破壊しヒト鼻上皮細胞のインスリン透過性を調節した。TLR3のリガンドであるpoly(I:C)によって誘導されたmiRNA-146aは上皮バリアを増強し炎症反応の負の制御因子として作用した。この研究はC-CPE194、C-CPEm19およびmiRNA-146aが鼻粘膜を介した安全かつ調節可能な新規薬物送達システムを開発する上で重要な役割を果たしうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The human nasal mucosa forms a continuous barrier via tight junctions. The paracellular pathway regulated by tight junctions is important in intranasal administration across the nasal mucosa. Clostridium perfringens enterotoxin (C-CPE) mutants C-CPE194 and C-CPEm19 disrupted the tight junctional barrier without a cytotoxic effect and regulated the permeability of insulin across human nasal epithelial cells. Also, miRNA-146a induced by TLR ligand poly(I:C) enhanced the epithelial barrier and acted as a negative regulator of inflammatory responses in human nasal epithelial cells. This study suggests that C-CPE194, C-CPEm19 and miRNA-146a may play a key role in developing a safety and adjustable novel drug delivery system across the nasal mucosa.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：タイト結合分子バインダー C-CPE microRNA ヒト鼻粘膜上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

脳には血液脳関門(blood-brain-barrier)があるため、経口投与や静脈投与といった全身循環を介した中枢神経系に対する薬物輸送は困難とされている。鼻腔内へのインスリン投与は全身循環への移行を伴わずに脳内へ直接移行することが報告されている。そのため、近年鼻粘膜を介した薬物輸送システムが見直されてきており、アルツハイマー病の治療に応用できる可能性が示唆されている。

鼻粘膜を経て鼻腔内投与する場合、タイト結合によって調節される傍細胞経路が重要である。Clostridium perfringens の毒素の C 末端フラグメント(C-CPE)は、タイト結合タンパク質である claudin に結合し、細胞毒性効果を誘導せずにタイト結合のバリアを破壊する。この C-CPE 変異体である C-CPE 194 は、claudin-4 にのみ結合し、また C-CPE 194 変異体の C-CPE m19 は、claudin-4 のみならず claudin-1 にも結合する。しかし、正常なヒト鼻上皮細胞(HNEC)に対する C-CPE 194 および C-CPE m19 の詳細な効果は未だ不明であった。

また、HNEC は Toll 様受容体(TLRs)を介して侵入する病原体に対する防御的なバリア機能、および自然免疫防御において重要であるマイクロ RNA(miRNA)は、直接的または間接的な標的遺伝子としてタイト結合の発現を調節し、バリア機能を維持する。しかし、TLR による HNEC の上皮障壁における miRNA の役割は未知のままであった。

2. 研究の目的

本研究では、タイト結合分子バインダー(C-CPE)および microRNA(activator, inhibitor)による安全で調節可能なヒト鼻粘膜を介した新規 drug delivery system を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

実験には手術によって得られた下甲介粘膜上皮より上皮細胞を分離培養後、テロメラーゼ逆転写酵素(human telomerase reverse transcriptase; hTERT)を遺伝子導入し延命化した鼻粘膜上皮細胞を用いた。

タイト結合分子 claudin に特異的に結合可能な C-CPE を用いて、HNEC のバリア機能の変化を細胞毒性とともに詳細に解析した。さらに、タイト結合分子および様々なシグナル伝達への影響を検討し、その作用のメカニズムを解析した。

また鼻粘膜バリアに影響を与え自然免疫に密接な関与がみられる TLR3 リガンド poly(I:C)でヒト HNEC を処理し、microRNA の発現変化を microRNA array を用いて調べた。その後、変化のみられた microRNA を用いて、上皮バリアへの影響を調べた。

4. 研究成果

(1)HNEC における C-CPE 変異体の細胞傷害効果：HNEC における C-CPE 変異体の細胞毒性を調べるために、細胞を 2 または 4 μg/ml の C-CPE 194, C-CPE m19 で 24 時間処理し、細胞生存率アッセイを行った。細胞毒性効果は C-CPE194, C-CPEm19 のいずれの濃度においても観察されなかった。

(2)HNEC におけるバリア機能とフェンス機能に及ぼす C-CPE 変異体の影響：HNEC を C-CPE 194 および C-CPE m19 で処理し、細胞生存率アッセイを行った。C-CPE 194 および C-CPE m19 とともに細胞毒性を認めなかった用量で処理し、電気抵抗法(TEER)で測定を行った所、時間依存的に明らかなバリア機能の低下がみられた(図 1)。

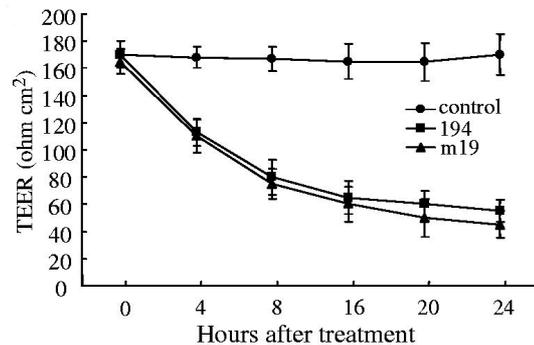


図 1：C-CPE 変異体による処理とバリア機能(TEER)

(3)HNEC におけるタイト結合タンパク質の発現と局在に及ぼす C-CPE 変異体の影響：HNEC におけるタイト結合分子の発現に C-CPE が影響を与えるか検討した。C-CPE 処理による claudin-1, 4, 7 及び occludin の発現の変化は認められなかった。また、局在の変化も認められなかった。

(4)HNEC における処置後の C-CPE 変異体の挙動：処置後の HNEC における C-CPE 変異体の挙動を調べるために、抗 his タグ抗体を用いて免疫沈降後にウェスタンブロッティングを行った。Claudin-4 結合 C-CPE 194 は処置後 4 時間から 24 時間に減少したが、claudin-7 結合 C-CPE 194 は処置後 4 および 8 時間に検出された。Claudin-4 および 7 結合 C-CPE m19 は、処置の 4, 8 および 24 時間後に検出された。今回の研究では、C-CPE 変異体による処理後のいずれのサンプルにおいても claudin-1 は検出されなかった。

(5)C-CPE 変異体は、HNEC における ERK1/2 リン酸化活性を一時的に増加させる：C-CPE の HNEC における MAPK シグナル伝達への影響を検討した。C-CPE 処理により MEK inhibitor である U0126 で阻害可能な、明らかな ERK1/2 のリン酸化の亢進が認められた。

(6)MAPKK 阻害剤は，HNEC における C-CPE 変異体によって誘導されたバリア機能のダウンレギュレーションを防止する：C-CPE 変異体によるバリア機能のダウンレギュレーションに関するシグナル経路を調べるために，各種阻害剤を用いて TEER 値を測定した．TEER 値は MAPKK 阻害剤 U0126 のみによって増強され，C-CPE194 または C-CPEm19 によって誘導される TEER 値の減少は U0126 によって抑制された(図 2)．

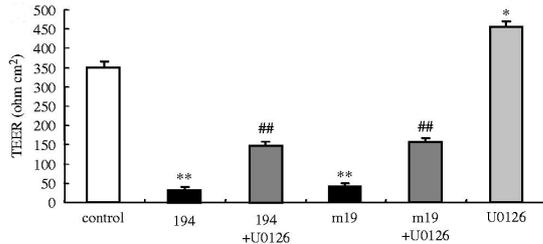


図 2 : C-CPE 変異体，U0126 による処理とバリア機能(TEER)

(7)C-CPE 変異体は，HNEC を通した FITC-インスリンの透過性を高める：C-CPE 194 または C-CPE m19 で処理した後，FITC 標識ヒトインスリンで内腔の細胞を処理した．C-CPE 194 および C-CPE m19 における外側チャンバーの FITC-インスリンは，対照と比較して用量依存的に有意に増加した．両 C-CPE 変異体による FITC-インスリンの増加は，MAPKK 阻害剤 U0126 によって阻害された(図 3)．

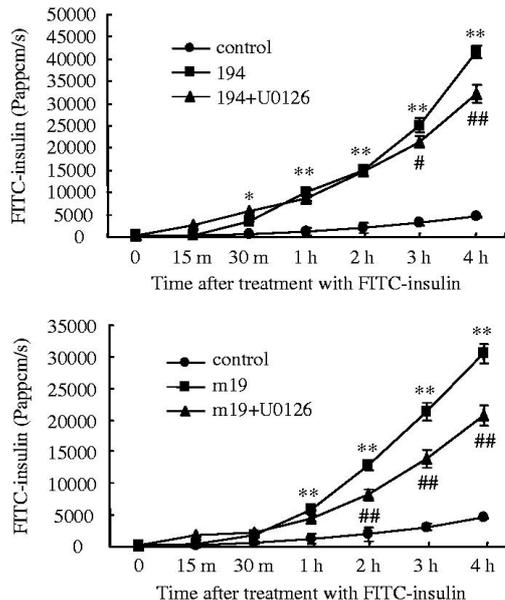


図 3:C-CPE 変異体 U0126 による処理と FITC-インスリン透過性

(8) HNEC における poly(I : C) によって誘導されるマイクロ RNA の発現：50 µg/ ml の

poly(I : C) で 24 時間処理した hTERT-HNEC と対照群について miRNA アレイ分析を行った．Poly(I:C) で処理した細胞では，72 個の miRNA がアップレギュレートされ，15 個の miRNA がダウンレギュレーションされた．このうち，2 倍以上の差を持つものの miRNA mimic，阻害剤で HNEC 処理したところ miR-146a の mimic がタイト結合に影響を与えた．

(9) poly(I : C) は，HNEC における PI3K，JNK および NF- B 経路を介した miR-146a のアップレギュレーションを誘導する：poly(I:C) による miR-146a の発現の増加をリアルタイム PCR にて確認した．また，この変化は PI3K 阻害剤 LY294002，JNK 阻害剤 SP600125，NF- B 阻害剤クルクミンによって阻害された(図 4)．

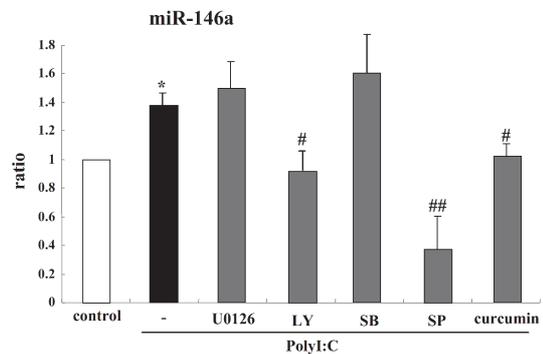


図 4 : poly(I:C)，LY294002，SP600125，クルクミンによる処理と miR-146 の発現

(10) miR-146a mimic は，HNEC におけるタイト結合タンパク質および上皮バリアの発現を誘導する：正常な HNEC における上皮のタイト結合バリアに対する miR-146a の効果を調べるために，hTERT-HNEC を miR-146a mimic でトランスフェクトした．miR-146a mimic によるトランスフェクション後の miR-146a の過剰発現は，hTERT-HNEC におけるタイト結合タンパク質 claudin-1，occludin および JAM-A の発現を誘導したが，claudin-4,7，LSR および TRIC は変化を認めなかった．また，上皮バリアの経上皮電気抵抗(TER)は，miR-146a によるトランスフェクションによって一時的に増加した．

(11) miR-146a mimic は，HNEC における poly(I : C) によって誘導されるタイト結合タンパク質の減少および炎症性サイトカインの放出を防止する：hTERT-HNEC において claudin-1 および JAM-A タンパク質の発現は，50 µg/ ml の poly(I : C) による処理によって減少した．また，この反応は miR-146a mimic の前処理によって阻害された．免疫染色では，poly(I : C) で処理した後，hTERT-HNEC の境界で claudin-1，JAM-A および occludin の発現が一部消失した．この変化は，miR-146a mimic で処理することによって阻害された(図 5)．

さらに、ELISAにおいて、miR-146a mimicは、poly(I:C)による処理によって誘導されたIL-8およびTNF- α の分泌のアップレギュレーションを阻害した(図6)。

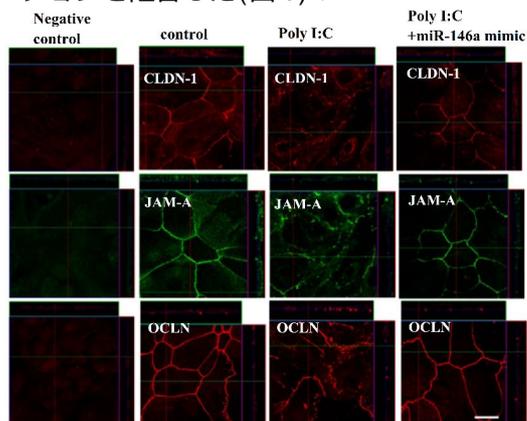


図5: poly(I:C), miR-146a mimicによる処理と claudin-1, JAM-Aの発現

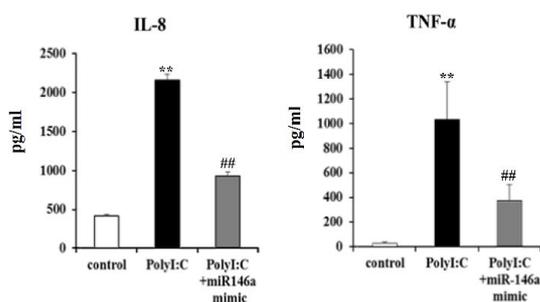


図6: poly(I:C), miR-146a mimicによる処理と IL-8, TNF- α 分泌

(12) miR-146a mimicは、HNECにおけるPoly(I:C)による TRAF6のアップレギュレーションを防止する:TLR3 媒介 TNF レセプター関連因子 6(TRAF6)は miR-146aの直接のターゲットの一つである。HNEC中のmiR-146aが TRAF6に影響を与えるかどうかを調べた。ウェスタンブロットでは、50 μ g/mlの poly(I:C)は hTERT-HNECの TRAF6を誘導し、miR-146a mimicは TRAF6のアップレギュレーションを妨げた。

C-CPE 変異体は、HNECにおいて細胞の傷害なくタイト結合のバリア機能、フェンス機能を破壊し、タンパク質の発現および claudin-1, -4, -7 および occludinの局在化を変化させ、上皮細胞におけるインスリンの透過性を増強した。

また、TLR3 リガンド poly(I:C)によって誘導された miR-146aは HNECにおいて上皮バリアを増強し、炎症反応の負の制御因子として作用した。

C-CPE 変異体と miRNA-146aの制御により、鼻粘膜を介した安全かつ調節可能な薬物投与経路を構築することができる可能性が示唆された。

参考論文

1. Brunner YF, Benedict C, Freiherr J. Targeting the brain through the nose: effects of intranasally administered insulin. *Nervenarzt*. 2013 84:949-954.
2. Takano K, Kojima T, Go M, et al. HLA-DR- and CD11c-positive dendritic cells penetrate beyond well-developed epithelial tight junctions in human nasal mucosa of allergic rhinitis. *J Histochem Cytochem*. 2005 53:611-619.
3. Kojima T, Keira T, Takano K, et al. Claudin-binder C-CPE mutants enhance permeability of insulin across human nasal epithelial cells. *Drug Deliv*. 2016 23(8):2703-2710
4. Miyata R, Kakuki T, Nomura K, et al. Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2015 15;761:375-82
5. Sawada N, Murata M, Kikuchi K, et al. Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc*. 2003 36:147-156.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢島 諒人 (YAJIMA RYOTO)

札幌医科大学，医学部，研究員

研究者番号：90722455

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()