

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659394

研究課題名（和文）腸上皮バイオカプセルを用いた新規薬剤デリバリーシステムの開発

研究課題名（英文）Development of a novel drug-delivery system by a bio-capsule that is built by primary intestinal epithelial cells.

研究代表者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10175127

研究成果の概要（和文）：

腸上皮バイオカプセル作成法の確立に向け、安定してバイオカプセルを作成し得る独自の培養条件を同定し、同バイオカプセルは幹細胞を豊富に含む細胞群から成る事を明らかとした。また薬剤含有バイオカプセル作成技術の開発に於いて、P-Glycoprotein 基質であるRhodamine123が内腔に集積する性質がある事を示した。これらは腸上皮由来バイオカプセル作成の基本技術として重要な成果であると考えている。

研究成果の概要（英文）：

Through our studies aimed to establish novel methods to generate “bio-capsules” that are built by intestinal epithelial cells, we succeeded to identify a distinct culture condition, which allows us to produce “bio-capsules” in a highly efficient manner. In addition, we found that the capsules that were generated by the present method are consisted with high number of intestinal stem cells. Also, we confirmed that Rhodamine123, a substrate of P-glycoprotein, could easily accumulate within the inner space of the bio-capsule. These findings establish the basis for the efficient generation of drug-containing, intestinal epithelial cell-derived bio-capsules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・下部消化管学(小腸・大腸)

キーワード：腸管上皮、バイオカプセル、薬剤デリバリー、炎症性腸疾患、初代培養法

## 1. 研究開始当初の背景

我が国に於いて急増かつ難治化し、慢性炎症と組織再生不全が一体となった病態を呈する炎症性腸疾患に対し、炎症制御と組織再生を同時に実現する治療法の開発は今なお急務である。腸管疾患に対する薬剤投与として経口・経静脈投与の他、注腸投与が一般的である。しかしながら、副作用の軽減と病変部位への薬剤集積という点で改善が切望されている。従来から腸管疾患に対し、局所への薬剤デリバリーによって治療効果のステップアッ

プを試みた研究は存在した。しかしながら、いずれも腸管局所への集積能やデリバリー担体の安全性の点で未だ応用は困難であった。

研究代表者らは世界初の技術として、腸管上皮初代細胞の長期培養技術の開発に成功した。同技術による培養は、1) 1年以上の長期に渡り増殖・継代可能であり、2) 吸収能等の正常上皮機能を全て保持しており、3) 培養7日でシスト状の3次元構造を形成し上皮基底膜側を露出した最大径100-200 $\mu$ mの単細胞層の構造をとり、4) 密着結合にて内外腔を生

理的に隔離することが可能、という特長を持つ革新的腸上皮培養技術として、既に内外より高い評価を獲得していた。しかしながら、これを薬剤デリバリー担体として利用する試みは皆無であった。

## 2. 研究の目的

本研究では研究代表者らが世界に先駆けて開発した独自の画期的技術である腸上皮3次元培養法を損傷腸管粘膜指向性薬剤デリバリーシステムとして発展させ、「自己腸上皮バイオカプセル」を構築し、これを内視鏡と一体化した治療システムとして確立することにより、炎症性腸疾患に対する画期的治療法の開発、を目指した。

## 3. 研究の方法

① 腸管上皮バイオカプセル作成法の確立  
マウス腸管を用いたバイオカプセル作成法の至適条件を探索するため、種々の組み合わせで各種因子を培地に添加した条件で作成を行い、シスト構造の成立を指標に作成効率を評価した。また、同方法により作成されたシスト構造における細胞構成を評価するため、腸上皮幹細胞がEGFPで標識される遺伝子改変マウスを用い、作成したバイオカプセルにおける幹細胞の分布を評価した。更に作成したバイオカプセルをDSS腸炎モデルに投与し、損傷粘膜面への定着能についても検討を加えた。

② 薬剤含有バイオカプセル作成技術の確立  
P-Glycoprotein 基質であるRhodamine123及び、FITC標識デキストランを用い、これらを単に培地に添加するのみでバイオカプセル内への集積が可能であるか、タイムラプスイメージングによる定量的評価により、検討を加えた。

## 4. 研究成果

① 腸管上皮バイオカプセル作成法の確立  
マウス腸管組織からのバイオカプセル作成法の最適化を行い、以下の成果を得た。

- 1) マウス大腸組織より安定してバイオカプセルを培養し得る独自の技術を確認した。その必須因子としてWnt3a, BSA, EGF, HGF, Nogginを同定した。
- 2) 腸管上皮幹細胞特異的遺伝子LGR5のコード領域をEGFP並びにCreリコンビナーゼで置換したマウスを用いる事により、同手法により確立したバイオカプセルは腸管上皮幹細胞を豊富に含む上皮細胞群で構成されている事を明らかとした。
- 3) 上記方法によるバイオカプセル作成法は単一の幹細胞からも樹立可能であり、DSS投与により誘発された粘膜欠損・潰瘍面に選択的に生着し、潰瘍面を被覆する性

質を有し、かつ長期に渡り生着し得ることを明らかにした。これにより、DSS腸炎の臨床的経過を改善し得ることも明らかとした。

- 4) 上記バイオカプセル作成法はヒト消化管内視鏡生検検体を用いたバイオカプセル作成へも応用可能であることを確認した。

② 薬剤含有バイオカプセル作成技術の確立  
上記方法につき、薬剤含有バイオカプセルとして応用可能であるか、検討を行った。

- 1) 外面にP-Glycoprotein 基質であるRhodamine123を添加することにより、Rhodamine123がバイオカプセル内腔へ経時的に集積することを確認した。
- 2) 上記にて観察したRhodamine123の集積はP-Glycoproteinの阻害薬であるverapamilにより濃度依存的に解除されることを明らかにした。

上記の成果は、腸管上皮由来バイオカプセルが上皮再生治療のツールとして技術的に実現可能であり、なおかつP-Glycoproteinを介した内向きの輸送系が薬剤含有バイオカプセルの作成に有用である可能性を示した重要な成果であると考えている。

## 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5件)

- 1) Nemoto Y, Kanai T, Takahara M, Oshima S, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Bone marrow-mesenchymal stem cells are a major source of interleukin-7 and sustain colitis by forming the niche for colitogenic CD4+ memory T cells. *Gut*. (Epub ahead of print) 2012.  
(doi:10.1136/gut.jnl-2012-302029) 査読有
- 2) Yui S, Nakamura T, Sato T, Nemoto Y, Mizutani T, Zheng X, Ichinose S, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Clevers H, Watanabe M: Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5+ stem cell. *Nat Med*. 18:618-623, 2012.  
(doi:10.1038/nm.2695) 査読有
- 3) Yamaji O, Nagaishi T, Totsuka T, Onizawa M, Suzuki M, Tsuge N, Hasegawa A, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T,

Arase H, Kanai T, Watanabe M: The development of colitogenic CD4+ T cells is regulated by IL-7 in collaboration with NK cell function in a murine model of colitis. *J Immunol.* 188(6):2524-2536, 2012.

(doi:10.4049/jimmunol.1100371) 査読有

- 4) Nemoto Y, Kanai T, Shinohara T, Ito T, Nakamura T, Okamoto R, Tsuchiya K, Lipp M, Eishi Y, Watanabe M: Luminal CD4+ T cells penetrate gut epithelial monolayers and egress from lamina propria to blood circulation. *Gastroenterology.* 141:2130-2139, 2011.

(doi:10.1053/j.gastro.2011.08.035.) 査読有

- 5) Shinohara T, Nemoto Y, Kanai T, Kameyama K, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Totsuka T, Ikuta K, Watanabe M: Upregulated IL-7R  $\alpha$  expression on colitogenic memory CD4+ T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis. *J Immunol.* 186:2623-2632, 2011.

(doi:10.4049/jimmunol.1000057.9) 査読有

[学会発表] (計5件)

- 1) Watanabe M: Adult Stem Cell Therapy for Gastrointestinal Diseases. International Ulcer Week 2012. Tokyo, 2012年7月12日
- 2) Yui S, Nakamura T, Nemoto Y, Mizutani T, Fukuda M, Nozaki K, Yamauchi Y, Mochizuki W, Zheng X, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Regeneration of damaged colon epithelium by transplanted colon Lgr5+ stem cells maintained and expanded in vitro. 第10回幹細胞シンポジウム. 淡路島, 2012年6月1日
- 3) Watanabe M: Stem Cells. DDW. San Diego, U.S.A., 2012年5月22日
- 4) Mizutani T, Nakamura T, Morikawa R, Fukuda M, Mochizuki W, Yamauchi Y, Nozaki K, Yui S, Okamoto R, Tsuchiya K, Watanabe M: Real-time analysis of p-glycoprotein-mediated drug transport across primary intestinal epithelial cells three-dimensionally

cultured in vitro. DDW2012. San Diego, U.S.A., 2012年5月21日

- 5) Nemoto Y, Watanabe M: Luminal CD4+T cells penetrate gut epithelial monolayers and egress from lamina propria to blood circulation. 第15回国際粘膜免疫学会. Paris, France, 2011年10月25日

[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1件)

名称: 大腸上皮幹細胞の単離・培養技術と、これを用いた大腸上皮移植技術

発明者: 渡辺守、中村哲也

権利者: 東京医科歯科大学

種類: 特許

番号: W02013/061608 A1

取得年月日: 2013.5.2

国内外の別: 国際

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 守 (WATANABE MAMORU)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 10175127

### (2) 連携研究者

中村 哲也 (NAKAMURA TETSUYA)

東京医科歯科大学医歯学総合研究科・准教授

研究者番号: 70265809