

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460963

研究課題名(和文)炎症性腸疾患および炎症性発癌に対する新規デリバリーシステムを用いた治療法の開発

研究課題名(英文) A New Therapeutic Approach Using a Schizophyllan-based Drug Delivery System for Inflammatory Bowel Disease

研究代表者

竹田津 英稔 (TAKEDATSU, HIDETOSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80352144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患において核酸医薬の経口や注腸による局所治療が目ざされている。私たちは、真菌のシゾフィラン(SPG)がアンチセンスと複合体を形成する特性を利用し、腸炎の治療効果について検討した。デキストラン硫酸腸炎マウスモデルを使用し、人と同様にTNF- $\alpha$ をターゲットとした。SPG結合antisense TNF- $\alpha$ を作製し、TNF- $\alpha$ を産生するマクロファージへの効果的な取り込みと抑制効果を*in vitro*にて確認した。腸炎モデルに注腸投与を行なったところ、有意にTNF- $\alpha$ を抑制し、腸管炎症を改善させた。このデリバリーシステムを利用し、より効果的な局所治療効果が期待できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Antisense technologies for the inhibition of gene expression provide an effective strategy in inflammatory bowel disease (IBD). We have developed a delivery system for antisense using schizophyllan (SPG), a polysaccharide that belongs to the  $\beta$ -glucan family. This system has several advantages enabling the effective suppression of targeted RNA or DNA: SPG complex is stable and effectively taken up into macrophages through Dectin-1. TNF- $\alpha$  mainly produced by macrophages has been shown to have a pathogenetic role in IBD. The effect of antisense TNF- $\alpha$ /SPG complex to intestinal macrophages of DSS colitis was shown the increase of uptake into macrophages and the suppression of TNF- $\alpha$ . The rectal administration of antisense TNF- $\alpha$ /SPG complex effectively suppressed TNF- $\alpha$  production and significantly ameliorated intestinal inflammation.

Our result demonstrated the usefulness of local administered antisense/SPG as new therapeutic approach in IBD.

研究分野：炎症性腸疾患

キーワード：炎症性腸疾患 ドラッグデリバリーシステム アンチセンス

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は慢性の腸管炎症をきたす自己免疫疾患と考えられ、日本において患者数は増加傾向にある。炎症を惹起するサイトカインに対する抗体治療が使用され、抗 TNF- $\alpha$  抗体はその代表で優れた治療効果を示し、従来のステロイドや 5-ASA による治療戦略を大きく変化させた。基礎研究の結果が臨床で応用され、様々な分子標的治療が進められている。その分子標的治療の効果を高めるために細胞や臓器特異的に治療を行うことが重要であり、その方法としてドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が必要と考えられる。

シゾフィラン (SPG) は  $\beta$ -D グルカン (真菌) の一種であり、以前より抗腫瘍効果を期待され本邦において子宮頸癌患者に対し投与され、安全性も証明されている (Okamura K, Biotherapy, 1989)。SPG は水中で 3 重らせん構造をとっており、らせん構造はアルカリ溶液にて一本鎖に解離する。一本鎖は溶液を中性に戻すことにより再び疎水性相互作用と水素結合によって分子間の結合が生じ、再び 3 重らせん構造を形成する。北九州市立大学の櫻井らは、SPG 構造の再生過程においてアンチセンスオリゴヌクレオチド (antisense ODN) のような核酸を混ぜると、2 本の SPG と 1 本の核酸により 3 重らせん構造をとることを報告した (Sakurai K, Biomacromolecules, 2001)。SPG-antisense ODN 複合体は、DNase から分解をうけず非常に安定している。樹状細胞やマクロファージの dectin-1 レセプターを介した貪食作用により、通常よりも容易に細胞内にとりこまれるため、樹状細胞やマクロファージをターゲットとしたデリバリーシステムとして有効と考えられた。実際に私たちはマクロファージから分泌される macrophage inhibitory factor (MIF) を標的とし検討を行なった。その結果、SPG-antisense MIF 複合体がマクロファージからの MIF 産生を抑制し、全身投与が急性腸炎に対し治療効果を発揮することを明らかとした。(Takedatsu H, Molecular Therapy, 2012)

TL1A は TNF ファミリーサイトカインであり、IBD、特にクローン病患者の炎症組織において著明に増加している (Bamias G, J Immunol, 2003)。TL1A は主にマクロファージや樹状細胞から分泌され、細菌や免疫複合体によって分泌が増加する。さらに遺伝子解析により TL1A はクローン病の感受性遺伝子として発病に重要な役割を担っていることが報告されている (Yamazaki K, Hum Mol Genet, 2005)。私達は腸炎モデルを使用し、TL1A の発現が腸管炎症に伴い増加しており、さらに TL1A が腸管内で、IL-12 による Th1 細胞の活性化および IL-23 による Th17 細胞の活性化をも促進し、腸炎を増悪させることを明らかとした。実際に抗 TL1A 中和抗体投与を行ったところ、腸炎の著明な改善を認め

た (Takedatsu H, Gastroenterology, 2008)。また、TL1A トランスジェニックマウスは小腸炎を自然発症するため、TL1A は IBD の発症や炎症増悪において重要である。

MIF や前述した TL1A のようにマクロファージや樹状細胞由来のサイトカインが IBD 発症や増悪の病因となっており、新規治療法の開発のため、これらをターゲットとした核酸医薬の開発が必要と考えられた。核酸医薬による利点は、抗体治療と比較して局所投与が可能であるため臓器特異的で、安価で、副作用が抑えられることである。

## 2. 研究の目的

炎症性腸疾患に対する分子標的治療の開発が進み、治療効果が上がっているものの、徐々に効果が減弱することが問題となっている。近年、ICAM-1 のアンチセンスであるアリカフォルセン (Vegter S, Aliment Pharmacol Ther, 2013) や SMAD7 のアンチセンスであるモンジャーセン (Monteleone G, N Engl J Med 2015) など核酸医薬が IBD に有用であることが報告されている。そこで、新しい治療法としてドラッグデリバリーシステムを利用した核酸医薬により、より効果的に腸炎の治療を行うことを目的とした。計画として、抑制する遺伝子として IBD の病因の一つである TNF- $\alpha$  および前述した TL1A を選択し、SPG-antisense 複合体を作製し、樹状細胞やマクロファージを標的とし、腸炎に対する治療効果を検討する。特に注腸による局所治療を検討し、臨床応用にむけた治療法の実験を行う。

## 3. 研究の方法

### ・ SPG-antisense 複合体の作製

3 重らせんを形成している SPG を 0.25 N のアルカリ水溶液中に溶解させ、1 本鎖に解離させる。リン酸バッファーを用いてアルカリ溶液を中和する際に核酸溶液を添加する。SPG が 3 重らせん構造に再生する過程において核酸が SPG と複合化する様子をゲル電気泳動、ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) 等で確認する。複合化できる核酸塩基はアデニン (A) であり、アンチセンス配列にポリ A tail をつけることにより複合体を形成することができる。複合体効率を向上させる方法として核酸配列、試薬の調整を行った。

antisense TL1A の配列についてはマウス TL1A の mRNA に対して抑制効果をもつ配列をいくつか作製し、抑制効果について検討を行った。antisense TNF- $\alpha$  について以前より多数報告のある配列をアンチセンスとして使用した (Myers KJ, J Pharmacol Exp Ther, 2003)。

### ・ 腸炎モデルマウスにおける炎症性サイトカインの検討

2.5% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を 5 日間飲水させた DSS 急性腸炎モデルを使

用し、腸炎と正常腸管組織における炎症性サイトカイン発現解析を Real-time PCR にて検討した。また、腸炎組織の粘膜固有層より CD11b 陽性マクロファージをソーティングし、リポポリサッカライド(LPS)で刺激したあと、培養上清中の TNF- $\alpha$  の産生について ELISA にて検討を行った。

・腸管マクロファージにおける SPG-antisense TNF- $\alpha$  複合体取り込みについて検討

Dectin-1 は SPG や真菌のレセプターであり、樹状細胞やマクロファージに発現する。Dectin-1 により認識された真菌や SPG は、貪食され、細胞内にとりこまれ、分解される。この dectin-1 の発現についての腸炎組織と正常腸管組織の発現の違いについて Real-time PCR と FACS にて検討を行った。

さらに、複合体のマクロファージへの取り込みを確認するため、腸炎マウスの腸管固有粘膜細胞から CD11b 陽性マクロファージを分離、培養を行い、蛍光標識した SPG-antisense TNF- $\alpha$  複合体を添加し、取り込み能の検討を行った。細胞内への取り込みは、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて確認を行った。

・複合体による TNF- $\alpha$  の抑制効果

腸管より分離したマクロファージを培養し、アンチセンス、SPG 単独、および複合体を添加し、4 時間後に LPS で刺激し、TNF- $\alpha$  産生の抑制効果について検討を行った。抑制効果に必要な複合体の濃度や毒性について検討を行った。

・SPG-antisense TNF- $\alpha$  複合体の局所投与における治療効果の検討

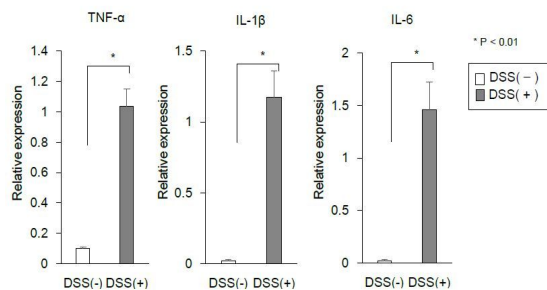
2.5% デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を 5 日間飲水させた DSS 急性腸炎モデルに対し治療効果の検討を行った。局所療法として週 3 回の注腸投与を行った。

腸炎所見についてマウス用の内視鏡 (Becker C, Gut, 2005) で経時的に確認を行った。治療効果は体重、腸管長、腸管の病理組織、腸管のサイトカイン発現について検討を行った。

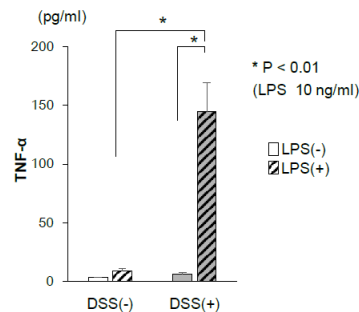
#### 4. 研究成果

複合体の作製について antisense に poly A tail を配列し、複合体化率の良い配列の検討を行った。Poly A tail は 60 塩基が最も効率よく、antisense + poly A60 tail にて複合体作製を行った。TL1A の antisense についてはマウスマクロファージを使用し、抑制効果の検討を行ったが十分な抑制効果が確認できず、今後の課題となった。Antisense TNF- $\alpha$  については抑制効果を認め、この antisense を利用し、研究を行った。

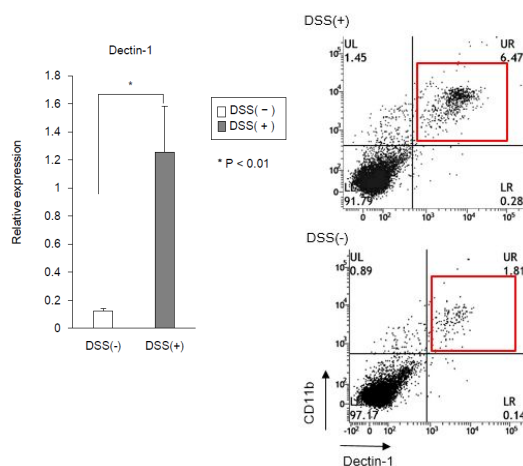
DSS 急性腸炎の解析ではこれまでの報告と同様に、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現の増加を認めた。(下図)



腸管より CD11b 陽性マクロファージを分離し、リポポリサッカライド (LPS) で刺激を行い上清中の TNF- $\alpha$  産生について検討を行った。正常腸管由来マクロファージからは TNF- $\alpha$  の産生はほとんど認められず、腸炎組織由来のマクロファージは LPS 刺激にて多量の TNF- $\alpha$  を分泌した。(下図)

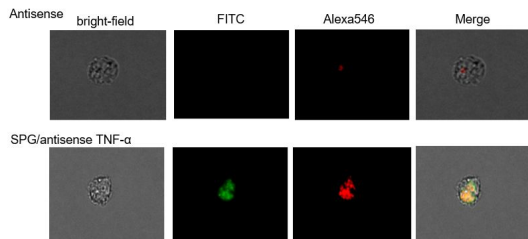


SPG や真菌のレセプターである Dectin-1 の発現は DSS 腸炎の腸管で発現増強しており、その発現は FACS 解析にて CD11b 陽性マクロファージにあることが分かった。(下図)

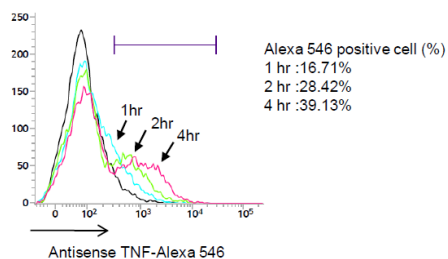


複合体のマクロファージに対する効果について検討を行った。腸炎組織よりマクロファージを分離し、その細胞に複合体を添加し、複合体の取り込みについて検討を行った。SPG を FITC で、antisense TNF- $\alpha$  を ALEXA586 で蛍光標識し、複合体の取り込みについて確

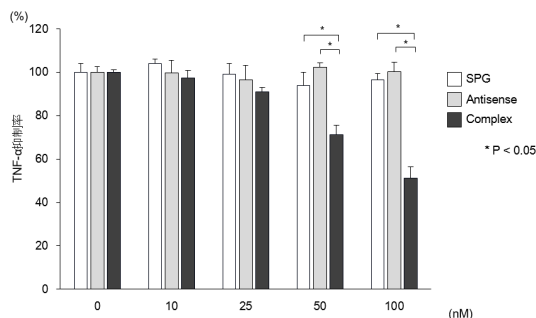
認した。Antisense 単独でほとんど取り込みは認められなかったが、複合体の投与により同部位に有意な取り込みが認められ、複合体として取り込まれることが確認された。(下図)



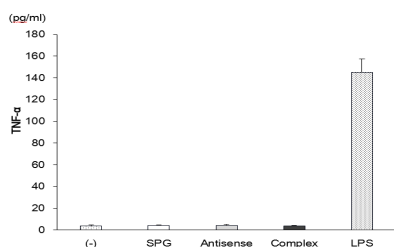
その取り込みについて FACS で確認を行ったところ、4 時間で約 40% のマクロファージに取り込みが認められた。(下図)



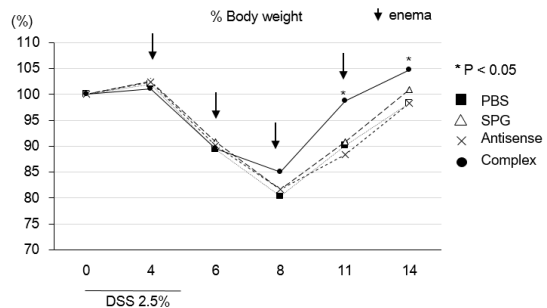
続いて腸管マクロファージに、SPG のみ、antisense、複合体をそれぞれ添加し 4 時間後に LPS 刺激を行い、TNF- $\alpha$  濃度を測定し、抑制効果の検討を行った。コントロール群では TNF- $\alpha$  の抑制効果も認められなかった。複合体の投与に濃度依存性に TNF- $\alpha$  の抑制を認めた。(下図)



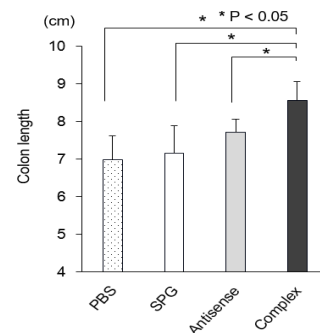
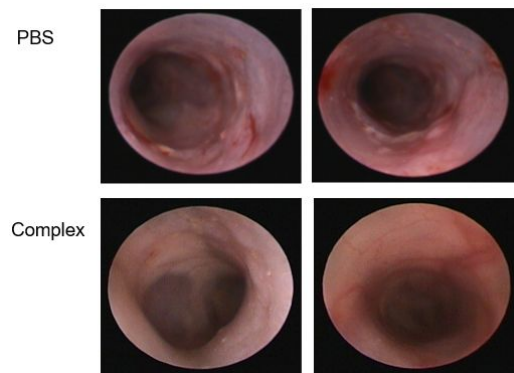
SPG、antisense、複合体をそれぞれマクロファージに添加し 24 時間後の TNF- $\alpha$  産生を確認した。SPG による TNF- $\alpha$  の産生は認められなかった。その結果、SPG 刺激によりマクロファージは TNF- $\alpha$  を産生しないことが明らかとなった。(下図)



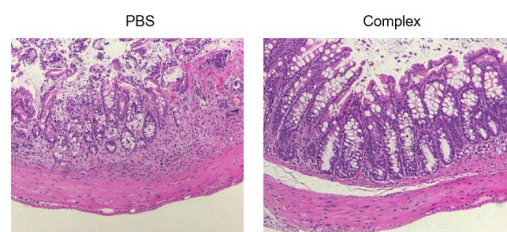
DSS 急性腸炎モデルに、それぞれ 0.5mg/kg を週 3 回の注腸投与を行い複合体の局所治療効果の検討を行った。コントロールと比較して複合体投与により腸炎によっておこる体重減少は著明に抑制された。(下図)

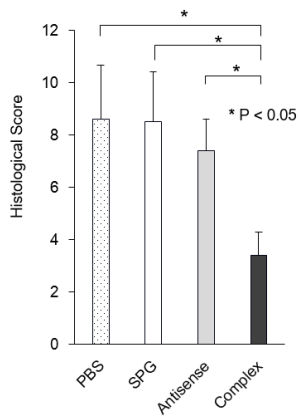


内視鏡による検討において、コントロール群ではびらん、潰瘍を形成し、重症腸炎を認められたが、複合体投与群では炎症の程度は軽度であった。炎症による腸管の短縮も改善を認めた。(下図)

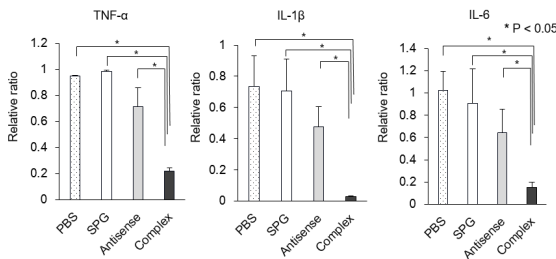


組織学的にもコントロール群で認められた炎症細胞の浸潤や潰瘍形成は著明に改善を認め、組織学的スコアも有意に改善を認めた。(下図)





腸管組織のサイトカイン発現について検討を行った。複合体投与群において、TNF- $\alpha$  抑制効果に加え、IL-1 $\beta$ 、IL-6 などの炎症性サイトカインの抑制を認めた。(下図)



以上より、SPG-antisense TNF- $\alpha$  複合体投与は in vitro にて TNF- $\alpha$  の産生を有意に抑制した。DSS 腸炎モデルに複合体の注腸投与を行ったところ TNF- $\alpha$  発現を抑制し、腸炎を有意に改善した。

今までの報告と同様に本研究においても TNF- $\alpha$  の発現を抑えることにより腸炎は著明に改善を認めた。antisense 投与単独では組織内への移行や安定性に問題が生じるが、この antisense に SPG と複合させるデリバリーシステムを利用し、より効果的な治療効果が期待できるものと考えられる。

SPG を使用したデリバリーシステムにより、核酸医薬が炎症性腸疾患に対する新しい治療戦略となりうる事が期待される。

#### 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 1 件)

1. Hidetoshi Takedatsu, Keiichi Mitsuyama, Takuji Torimura. Nanomedicine and drug delivery strategies for treatment of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2015 21(40): 11343-11352 査読有り

[学会発表](計 2 件)

1. 竹田津英稔、光山慶一、鳥村拓司  
炎症性腸疾患マウスモデルにおける Drug delivery system を利用したアンチセンス治療効果の検討  
第 52 回日本消化器免疫学会総会 シンポジウム 2015 年 7 月  
京王プラザホテル 新宿・東京

2. 竹田津英稔、光山慶一、鳥村拓司  
炎症性腸疾患における Drug delivery system を利用したアンチセンス治療効果の検討  
第 102 回日本消化器病学会総会 パネルディスカッション 2016 年 4 月  
京王プラザホテル 新宿・東京

[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  
竹田津 英稔 (TAKEDATSU, Hidetoshi)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：80352144

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
望月 慎一 (MOCHIZUKI, Shinichi)  
北九州市立大学・国際環境工学部・講師  
研究者番号：10520702