

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：34414

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893307

研究課題名(和文) 三次元腸管粘膜再構築モデルの作製と核酸製剤を用いた基礎的評価

研究課題名(英文) The construction of 3 dimensional intestinal tract and mucosa model and the basic examination using oligonucleotide medicine.

研究代表者

渡辺 知恵 (WATANABE, Chie)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：30737747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養細胞等の生体構成成分を用いて三次元腸管粘膜再構築の基礎モデルを作製し、腸管吸収性の異なる物質やオリゴ核酸分子をモデル医薬品とした再構築モデルの基礎的評価を行った。ヒトにおける薬物吸収予測・動態評価における評価系としての動物モデルの代替法としても、また動物実験では得難い詳細な作用機構の解析を行う上でも、本研究で得られた再構築基礎モデルは重要であるが、今後さらに継続して、現基礎モデルの改良を行い、核酸製剤や新規薬剤のデリバリーシステム開発に役立てたい所存である。

研究成果の概要(英文)：In this study, the basic model of 3 dimensional intestinal tract and mucosa was reconstituted in vitro using several biological materials. The model was also examined by the oligonucleotide medicine or materials which had different molecular sizes. This basic model was important for the substitutional assay system of animal experimental models which predict drug absorption and pharmacokinetics and for the precise analysis where in vivo analysis could not achieve.

研究分野：薬剤学

キーワード：核酸製剤 腸管粘膜再構築モデル

1. 研究開始当初の背景

3次元細胞培養法による生体再構築モデルの作製は、様々な医療分野での応用が期待されることから、再生医療分野において、iPS細胞の研究開発とともに、非常に盛んに開発が行われている。中でも、腸管粘膜層や、血液脳関門(BBB)の再構築モデルの作製は、薬物動態学や動物代替法開発の観点からも、重要課題の一つであった。

*in vitro*における腸管モデルとして、Caco-2細胞(ヒト大腸癌細胞)の単層培養モデルが汎用されている。Caco-2細胞は培養が比較的容易であり、長期培養により、腸管上皮様に分化することによるものであるが、このモデル上においては、大腸腸管上皮組織層のみしか再現できておらず、粘液分泌細胞であるGoblet細胞による粘液層やリンパ管・血管の脈管系などの重要な機構を反映することが不可能であった。

近年、大阪大学大学院工学研究科 明石満教授らのグループにより、細胞集積法により簡便に短時間で細胞を積層させて、3次元生体再構築モデルを作製する系が開発され、皮膚モデルが作製されており(Asano Y. et al Microscopy, 2014)異なる臓器のさらなる開発が期待される所である。

一方、近年、siRNAやアンチセンスヌクレオチド等の低分子オリゴ核酸を用いた核酸医薬品に対する期待が高まっている。核酸医薬品は、RNA干渉メカニズムにより、対象とする疾患に関係する遺伝子や蛋白質を直接標的とし制御するため、高い効果が期待される。しかしながら、核酸自体は体内で易分解性であり、一般的にはベクター等のキャリアーを必要とし、腸管において難吸収性であることなど、体内動態に係るハードルも多く、それらが障壁となり、これら核酸医薬の経口製剤化は未だ実現に至っていない。申請者のグループは、近年、核酸医薬の経口製剤化を最終目的とし、注腸法による腸管のリンパ経

路を介した、非ウイルス型内在性キャリアーおよび分散型脂質ナノ粒子を用いた核酸製剤のドラッグデリバリーシステム(DDS)開発を行ってきた(特許第5892658号:「経大腸吸収用医薬組成物」横田隆徳、村上正裕、仁科一隆、PCT/JP2011/004642、国際出願日2011年8月19日、中国特許ZL2011800500308)。このDDSは、世界初となるインジェクション法によらない核酸の全身性投与を可能としたものである。

腸管粘膜組織における、薬物吸収段階の制御およびその詳細なメカニズム解析はこのDDSの確立・改良において、非常に重要なものであるが、実際に*in vivo*における詳細解析は難しく、限界がある。特に、目的とする核酸製剤が腸管上皮を通過し、脈管系へと移行し、全身性に輸送されていく過程を詳細に解析することは難しい。そこで、*in vitro*腸管モデルの確立と、そのモデルを用いた核酸製剤の腸管吸収の制御検討およびメカニズム解析が必要であった。

2. 研究の目的

薬物が体内に吸収される過程において重要な腸管粘膜組織を、*in vitro*三次元細胞積層技術を基盤として再構築し、実際に核酸製剤等の開発中薬物の腸管透過段階における薬物動態予測および作用機序等詳細解析に用いる事により、最適な製剤処方の開発を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト腸筋繊維芽細胞を、種々の細胞外基質と組み合わせることにより、先述の明石満教授らが開発した*in vitro*三次元細胞積層技術における細胞集積法を用いて、インサート上に集積させ培養することにより、複数層からなる基層を構築した。

ヒト腸筋繊維芽細胞により構築した基層に各種血管内皮細胞を種々の条件下にて共

培養することにより、基層内部に脈管系の走行を構築させた。基層上部には、ヒト腸上皮系細胞を積層することにより、上皮層を作製した。さらに、上皮層上部に粘液層を形成させるため、種々の代替え水性ゲルを積層、もしくは、粘液の主成分である mucin を分泌することが可能な大腸杯細胞を上皮系細胞に混合することにより、粘液層を形成した。

腸管透過性、リンパ移行性の解析には、Cy3 蛍光標識化ビタミン E 結合型 siRNA を中心に、分子量の異なるオリゴ核酸等のモデル核酸を用いた。

なお、倫理面への配慮として、本研究において、ヒト由来細胞株を用いたが、すべての細胞は販売元にて、治験審査委員会認定のドナープログラムを通じて採取されているものを購入して実験を行い、当大学の指針と規則、「生命倫理・安全対策に対する取組」の方針に従って行った。

4. 研究成果

基層を構築するのに用いる腸筋繊維芽細胞は、先行技術で用いられている皮膚繊維芽細胞と違い、細胞自体の重量が軽い為、腸筋繊維芽細胞を用いた基層の作製は、種々の細かい実験条件の変更が細胞生存率や回収率の改善とともに必要であった。

また、細胞集積法にて複数層を形成させる際に、腸筋繊維芽細胞を細胞外基質で複数回コーティングする必要があるが、このコーティングに用いる基質が先行技術のファイブロネクチンでは安定した構築ができず、積層自体がインサートから剥離する現象を防止できなかった為、種々の細胞外基質の中から適応できる細胞外基質の組み合わせや、使用するインサートの基底膜を構成するメンブレンの組成について模索した。

最終的に、細胞外基質の組み合わせは、コラーゲンとラミニンを用い、それに自己組織化ペプチドを組み合わせ、インサートについ

ては、インサート膜自体がコラーゲンで構成されている ad-MED ビトリゲル（関東化学）を用いることにより、安定した腸筋繊維芽細胞から成る積層基層を構築した。

また、積層基層には、ヒト腸上皮系細胞を積層し、その中に大腸杯細胞を加えることにより、粘液層が寄与する非攪拌層の形成を行った。組織染色において、粘液層の主成分であるムチン層の形成が最上層部に確認されたものの、積層の電気抵抗値が低下する傾向が見られた。中性水性ゲルを用いて代替ゲル粘液層を積層すると、ゲルを積層していない層に比較して、電気抵抗値は変わらず、吸収促進剤等の刺激に対する電気抵抗反応時間が遅延するので、現条件下では、粘液層の形成が十分ではない可能性が考えられ、改良の余地がある。また、積層内への脈管系の走行形成は、腸筋繊維芽細胞から成る基層の安定した長期培養が必要であるが、共培養条件下において使用している各細胞間の増殖速度の違いや物理的な伸展力等により、構築の分解等を引き起こす為、長期の安定した構築形成が予想以上に困難であったため、現在継続して構築の改良を行っている。

siRNA が親水性であり、単独では腸管からの吸収は困難であるため、本研究で用いたモデル核酸であるビタミン E 修飾型 siRNA はビタミン E 修飾により脂溶性を向上させてあるが、これまで *in vivo* 系では、腸管吸収段階における詳細な機構が不明であった。本研究の共焦点顕微鏡を用いた解析により、Cy3 蛍光標識ビタミン E 修飾型 siRNA を吸収促進剤とともに腸管上皮層上部インサート内に添加すると、上皮層内部への核酸の浸潤が観察される一方、ビタミン E 非修飾型 siRNA では、吸収促進剤とともに同部位に添加し、時間が十分経過しても、その浸潤は確認されなかった。この結果は、*in vivo* 系において、ビタミン E 修飾型 siRNA は経腸にて標的臓器へ送達されるが、ビタミン E 非修飾型 siRNA

では送達されない結果と相関していた。さらに、分子量の異なるオリゴ核酸を用いても、siRNA と同様の結果が得られたことから、本研究において、核酸のビタミンE 修飾が核酸の腸管上皮層透過段階に必須であることが示唆された。

本研究において、*in vivo* 系では解析し難かった箇所の解析が一部可能となり、*in vivo* での実験結果との相関は得られたが、3D 生体再現構築モデルとして、特に脈管系と粘液層の構築の箇所については、依然改良の余地があり、今後継続して行っていく所存である。

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 2 件)

M. Murakami, K. Nishina, C. Watanabe, K. Yoshida-Tanaka, W. Piao, H. Kuwahara, Y. Horikiri, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, M. Yoshida, H. Mizusawa, T. Yokota. Enteral siRNA delivery technique for therapeutic gene silencing in the liver via the lymphatic route, Scientific Reports、査読有、5, 2015, 17035, DOI: 10.1038/srep17035.

M. Murakami, A. Matsumoto, C. Watanabe, Y. Kurumado, M. Takama, Fabrication of porous ethyl cellulose microspheres based on the acetone-glycerin-water ternary system: Controlling porosity via the solvent-removal mode, Drug Discoveries & Therapeutics、査読無、9、2015、303-309、DOI: 10.5582/ddt.2015.01053.

[学会発表](計 6 件)

C. Watanabe, K. Nishina, T. Yokotoa,

M. Murakami, Combination of Vitamin-E conjugation with lipid nanoparticle formulation as a novel enteral delivery technology for a systemic liver targeting of therapeutics oligonucleotides. 14th Annual congress of international Drug Discovery Science and Technology, 招待講演、2016年6月17日、Korea international exhibition center (京畿道高陽市, 韓国)

程緯、乾怜奈、渡辺知恵、仁科一隆、横田隆徳、村上正裕、ビタミンE結合siRNAの腸管上皮透過性の*in vitro*評価(1)、第65回日本薬学会近畿支部総会、2015年10月17日、大阪大谷大学(大阪府・富田林市)

小林慎也、渡辺知恵、小比賀聡、村上正裕、核酸分子の消化管における安定性の*in vitro*評価(2)、疎水修飾siRNAの腸管における安定性の*in vitro*評価、第65回日本薬学会近畿支部総会、2015年10月17日、大阪大谷大学(大阪府・富田林市)

小林慎也、渡辺知恵、仁科一隆、横田隆徳、村上正裕、疎水修飾siRNAの腸管における安定性の*in vitro*評価、日本薬学会第135年回、2015年3月26日、神戸サンボーホール(兵庫県・神戸市)

渡辺知恵、堀田幸佑、車戸祐、村上正裕、エチルセルロース多孔性マイクロスフィアの調製法: 細孔形成機構に関する検討、日本薬学会第135年回、2015年3月26日、神戸サンボーホール(兵庫県・神戸市)

村上正裕、渡辺知恵、下田浩、松本有、片岡一則、吉田-田中規恵、仁科一隆、横田隆徳、腸管リンパ系を介する核酸分子の肝特異的送達: リンパ移行性の証明、第38回日本リンパ学会、2014年6月20日、

北里大学（東京都・港区）

〔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

渡辺 知恵 （WATANABE, Chie）

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：30737747