

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14939

研究課題名(和文)核酸医薬の経口デリバリーを可能にするキトサン被覆DNAマイクロゲル製剤の開発

研究課題名(英文)Development of chitosan-coated DNA microgels for peroral delivery of nucleic acid drugs

研究代表者

西川 元也(Nishikawa, Makiya)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：40273437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性腸疾患に対する核酸医薬による治療システムの開発を目的に、「自己ゲル化核酸」技術を利用してキトサン被覆DNAマイクロゲル製剤の開発を試みた。まず、DNAハイドロゲルの粘膜面への投与可能性を検証するために、免疫刺激性CpG1668結合DNAハイドロゲルを開発した。CpG1668結合DNAハイドロゲルのマウス膣内への投与により、高いサイトカイン産生、単純ヘルペスウイルス2型の増殖抑制が得られた。次いで、CpG1668結合DNAハイドロゲルをキトサンで被覆したマイクロゲル製剤を開発した。キトサンの被覆により、酸性条件下およびDNA分解酵素存在下におけるDNAハイドロゲルの安定性は顕著に増大した。

研究成果の概要(英文)：To develop nucleic acid-based therapeutic systems for inflammatory bowel diseases, we tried to develop chitosan-coated DNA microgels, which prevent the intestinal degradation and delivery to the lower intestine, the main target of the diseases, of nucleic acids, based on the “self-gelatinizable nucleic acid” technology. The applicability of DNA hydrogel to mucosa was first examined using DNA hydrogel harboring CpG1668, an immunostimulatory DNA. Intravaginal administration of CpG1668/DNA hydrogel resulted in high cytokine production and efficient inhibition of the growth of simplex herpes virus type 2. Then, chitosan-coated DNA microgels were developed. Chitosan-coating significantly increased the stability of DNA hydrogel in acidic solutions or DNase-containing solutions. These results indicate that the chitosan-coated DNA microgels developed in this study will lead to the development of nucleic acid-based therapeutic systems for inflammatory bowel diseases.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：核酸 DNA ハイドロゲル 経口投与 キトサン

1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患の病態や腸内細菌と消化管との相互作用に関する研究が進展し、消化管細胞における核酸認識の生理学および病理学的重要性が明らかになってきた。そこで、核酸を利用した炎症性腸疾患の治療が試みられ、安定化修飾を施した核酸誘導体を皮下あるいは腹腔内投与することによる治療の可能性が報告されている。申請者らはこれまでに、DNA リガーゼを用いることなく DNA と水、塩のみを構成要素としてハイドロゲルを作製する「自己ゲル化核酸」技術を独自に開発し、この技術を利用することで非メチル化シトシン - グアニン配列を含む DNA (CpG DNA) などの免疫刺激性核酸の活性を飛躍的に向上でき、また徐放化が可能なことを見出した。炎症性腸疾患に対しても核酸医薬のハイドロゲル化による高機能化の利用が考えられるが、その実現には解決すべき障壁が存在する。一つは消化管内での核酸の分解である。また、炎症性腸疾患の標的となる消化管下部への送達には小腸での吸着・吸収も障壁となる。こうした問題を解決する方法として腸溶性コーティングや微粒子(マイクロ粒子)化が挙げられるものの、核酸を対象とした検討は報告されていない。

最近、米国 FDA に承認された Kynamro をはじめとする核酸医薬は注射剤であり、服用が容易な経口投与型製剤は開発されていない。本研究では、核酸医薬を効率よく消化管内の標的細胞に送達可能な新規の経口投与型製剤の開発を目指す。これに成功すれば「核酸医薬の経口投与による消化管疾患治療」という新たな治療戦略の発展にも繋がること期待される。さらに、本研究で開発する DNA ハイドロゲルで構成されたマイクロ粒子製剤を利用することで、機能性核酸を経口投与で簡便に消化管細胞に送達できるようになれば、本研究で対象とする炎症性腸疾患に限らず、消化器癌や経口感染症に対しても核酸医薬による疾患治療の可能性が広がると考えられる。また、消化管粘膜以外に自然免疫の活性化ならびに徐放化による疾患治療効果の増強が期待できる、膣や鼻腔などの粘膜への適用も可能と考えられることから、DNA ハイドロゲルの適用にもつながると考えられる。核酸医薬を DNA ハイドロゲルに組み込んだ一連の研究から、本研究で開発するキトサン被覆 DNA マイクロゲル製剤においても核酸医薬の生理活性を飛躍的に向上できることが十分に予想される。近年、核酸が腸管免疫に深く関与することが解明されつつあるが、経口投与により機能性核酸の消化管細胞への送達を可能にする本製剤は、核酸の腸管免疫における役割を解明する有用なツールとしての利用も期待される。

2. 研究の目的

本研究では、経口投与した核酸医薬を消化管内の標的細胞へ効率的に送達する「キトサ

ン被覆 DNA マイクロゲル製剤」を開発する。また、DNA ハイドロゲル製剤の粘膜面への適用可能性を検証するために、CpG DNA ハイドロゲルのマウス膣内への投与による自然免疫の活性化についても検討する。

3. 研究の方法

(1) DNA ハイドロゲルの膣内投与による自然免疫の活性化

細胞培養

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞は、血清含有 RPMI1640 培地で培養した。アフリカミドリザル腎臓上皮細胞株 Vero 細胞は血清含有 DMEM 培地で培養した。

オリゴデオキシヌクレオチド

DNA ハイドロゲルの調製にはホスホジエステル (PO) 型オリゴデオキシヌクレオチド (ODN) を用いた。一方、免疫刺激性核酸にはホスホロチオエート (PS) 化 CpG DNA である CpG1668 (5' -TCCATGACGTTCCCTGATGCT-3') を選択した。上記 ODN と 5' 末端を aminoethyl 修飾した CpG1668 は Integrated DNA Technologies 社より購入した。5' 末端を Alexa Fluor488 で修飾した CpG1668 は Japan BioService 社から購入した。Aminoethyl 修飾 CpG1668 を N-succinimidyl 3-[¹²⁵I]iodobenzoate と反応させることで ¹²⁵I 標識 CpG1668 (¹²⁵I-CpG1668) を得た。標識体の放射化学的純度は 97% 以上であった。

CpG1668 搭載 hexapodna および DNA ハイドロゲルの作製

既報に従い、6 種類の ODN を用いることで hexapodna を作製した。この際、hexapodna を構成する ODN の一本に CpG1668 に相補的な配列を挿入することで、CpG1668 搭載 hexapodna を得た。互いに相補的な接着性末端配列を有する 2 種類の CpG1668 搭載 hexapodna を混合することで、CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲルを作製した。CpG1668 に相補的な配列を非相補配列に置き換えることで、CpG1668 / hexapodna 混合物および CpG1668 / DNA ハイドロゲル混合物も用意した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動により DNA 構造体の形成を確認した。また、DNA サンプルにブルーデキストラン溶液を重層し、その混合の様子を指標にハイドロゲルの形成を視覚的に評価した。

RAW264.7 細胞での評価

Alexa Fluor488 標識 CpG1668 または Alexa Fluor488 標識 CpG1668 搭載 hexapodna を細胞に添加し、37 °C で 2 時間インキュベートしたときの細胞の蛍光強度を指標に取り込みを評価した。別途、RAW264.7 細胞を CpG1668 または CpG1668 搭載 hexapodna と 37 °C でインキュベートし、8 時間後に回収した細胞上清中の TNF- α 濃度を ELISA 法により測定すること

で細胞の活性化能を評価した。

DNA ハイドロゲルからの CpG1668 の放出
¹²⁵I 標識 CpG1668 を含む DNA サンプルを Transwell のインサート中に添加し、37 でインキュベートした。下層の溶液を経時的に回収し、放射活性を測定することで CpG1668 の放出性を評価した。

DNA の腔内投与

7 週齢の C57BL/6J 雌性マウスは Japan SLC から購入した。DNA 投与の 7 日前に酢酸メドロキシプロゲステロン (MPA) を皮下投与することでマウスの性周期を統一した。DNA はあらかじめ先を丸めた 29 ゲージ針付シリンジを用いてマウス腔内に注射投与した。

腔内投与後の DNA 消失

インターカレータである SYBR Gold で蛍光標識した hexapodna または DNA ハイドロゲルを MPA 処置マウスの腔内に投与した。経時的にマウスを解剖し、生殖器部分の蛍光を LAS3000 で観察した。別途、腔内洗浄液を回収し、回収物中の蛍光強度を測定することで残存 DNA 量を評価した。

¹²⁵I 標識 CpG1668 腔内投与後の放射活性の体内分布

¹²⁵I 標識 CpG1668 を腔内投与した MPA 処置マウスから経時的に血液と腔組織を回収した。血清および腔組織中の放射活性をガンマカウンターで測定した。

腔組織中の mRNA 発現の定量

MPA 処置マウスに CpG1668 または CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲルを腔内投与し、24 時間または 48 時間後に腔組織を回収した。総 mRNA を抽出し、RT-PCR 法によりサイトカインおよびケモカインの mRNA を定量し、 β -アクトチンの mRNA に対する比で表した。

腔組織および所属リンパ節でのサイトカイン産生

投与 24 または 48 時間後に腔洗浄液を回収後、腔組織および腸骨リンパ節を回収した。組織についてはホモジナイズし、遠心後の上清を回収した。IL-12p40 および IL-6、IFN- γ 濃度を ELISA 法にて測定した。

2 型単純ヘルペスウイルス感染

Vero 細胞を用いて 2 型単純ヘルペスウイルス (HSV-2) の UW268 株を培養した。MPA 処置マウスの腔内に DNA サンプルを投与し、その 2 日後に HSV-2 を腔内に感染させた。感染 2 日後に腔分泌液を回収し、プラークアッセイにより HSV-2 力価を定量した。

(2) キトサン被覆 DNA ハイドロゲル微粒子の開発

化合物

超高純度の水溶性キトサングルタミン酸塩 (平均分子量 150,000 ~ 600,000) は FMC biopolymer から購入し、定法に従い FITC 標識を施した。分子量約 500,000 の FITC デキ

ストランは Sigma-Aldrich から購入した。ODN は (1) と同様の方法で入手した。

DNA ハイドロゲルおよびキトサン被覆 DNA ハイドロゲルの作製

(1) と同様、2 種類の hexapodna を混合することで DNA ハイドロゲルを作製した。DNA ハイドロゲルを加温し、キトサン溶液中に滴下した。20 で 16 時間インキュベート後、キトサン被覆 DNA ハイドロゲルを回収した。適宜、キトサンによる被覆を確認するために、FITC 標識キトサンを用いて作製し、蛍光画像を撮影した。

キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアの作製

キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアはエマルション法により作製した。DNA ハイドロゲル含有エマルションを作製し、別途作製したキトサングルタミン酸塩含有エマルションと混合することで、キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアを得た。

キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアの物性評価

DAPI で染色した DNA と FITC 標識キトサンの分布を蛍光顕微鏡で観察した。キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアのサイズは顕微鏡下測定した。

キトサン被覆 DNA ハイドロゲルからの DNA 放出

Alexa Fluor488 標識 DNA を用いて作製した DNA ハイドロゲルを Transwell のインサート中に添加し、37 でインキュベートした。下層には pH 3 の緩衝液または DNase I 含有溶液を添加した。経時的にインサート中に残存する DNA 濃度を測定した。

十二指腸内投与後の消化管内での移動距離

検討には Japan SLC から購入した 4 週齢の ICR 雄性マウスを用い、24 時間の絶食後実験に用いた。イソフルランの吸入麻酔下、マウス腹部皮膚を切開し、十二指腸を腹腔から取り出した。FITC-dextran を含むサンプルを十二指腸内に投与後、十二指腸を腹腔内に戻し、腹部の開口部をクリップで閉じた。投与 4 時間と 8 時間後に小腸と盲腸、結腸を回収し、小腸は 8 分割した。各部位をホモジネートし、遠心上清中の蛍光強度を測定した。未処置マウスについても同様の操作をして、その値をバックグラウンドとしてサンプル投与群の値から差し引いた。FITC-dextran 由来の蛍光が観察された位置をもとに、平均移動距離を算出した。

4. 研究成果

(1) DNA ハイドロゲルの腔内投与による自然免疫の活性化

CpG1668 搭載 hexapodna の形成

ポリアクリルアミド電気泳動の結果、CpG1668 は、CpG1668 に相補的な配列を持つ hexapodna と効率よく複合体を形成することが確認された。一方、非相補配列の hexapodna と混合した場合には、CpG1668 は hexapodna と相互作用せず、CpG1668 単独と同じ位置に泳動された。また、互いに相補的な接着末端を有する 2 種類の CpG1668 搭載 hexapodna を混合した場合には、CpG1668 はほとんど泳動されないことが示された。

CpG1668 搭載 hexapodna の RAW264.7 細胞との相互作用

Alexa Fluor488 標識 CpG1668 を用いて RAW264.7 細胞での細胞取り込みを評価した。その結果、Alexa Fluor488 標識 CpG1668 単独と比較して、Alexa Fluor488 標識 CpG1668 搭載 hexapodna 添加時の細胞の蛍光強度は有意に高かった。また、細胞からの TNF- α の産生も、CpG1668 を hexapodna に搭載することで有意に上昇した。

CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲルの形成と CpG1668 の放出

互いに相補的な接着末端を有する 2 種類の hexapodna を混合したサンプルにブルーデキストラン溶液を滴下したところ、両者は混合せずにブルーデキストラン溶液が重層されたことから DNA ハイドロゲルの形成が示唆された。そこで、 ^{125}I 標識 CpG1668 を用いて DNA ハイドロゲルからの放出を評価した。Transwell のインサート中に ^{125}I 標識 CpG1668 を添加した場合、ほぼすべての放射活性が 1 時間以内に下層に回収された。これに対し、 ^{125}I 標識 CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲルをインサート中に添加した場合には、下層に移行した割合はインキュベート 48 時間の時点においても約 30%に留まった。したがって、DNA ハイドロゲルが CpG1668 の徐放に有用であることが示された。

腔内投与後の DNA ハイドロゲルの消失

SYBR Gold 標識 DNA をマウスの腔内に投与したところ、SYBR Gold 標識 DNA ハイドロゲルが SYBR Gold 標識 hexapodna よりも長時間投与部位である腔内に滞留することが示された。蛍光強度を指標に定量したところ、SYBR Gold 標識 DNA ハイドロゲルの場合には投与 24 時間後に約 50%が残存した。一方、SYBR Gold 標識 hexapodna では投与 9 時間の時点で検出限界以下となり、腔内投与した hexapodna が速やかに投与部位から消失すること、この消失がハイドロゲル化により大きく抑制されることが明らかとなった。

CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲル腔内投与後の CpG1668 の体内挙動

^{125}I 標識 CpG1668 を腔内投与したところ、 ^{125}I の放射活性は腔から速やかに消失した。これに対し、 ^{125}I 標識 CpG1668 搭載 DNA ハイ

ドロゲルを投与した場合には腔内からの消失が大きく遅延した。この挙動と対応して、 ^{125}I 標識 CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲル投与マウスでは、 ^{125}I 標識 CpG1668 投与マウスとは異なり、血清中の ^{125}I 放射活性が徐々に上昇する傾向が認められた。これは、DNA ハイドロゲルが腔内で分解酵素によって徐々に分解され、CpG1668 を含む中分子化された分解物が全身循環中に移行した結果と推察した。

腔内投与後のサイトカインおよびケモカインの発現

CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲルを腔内に投与することで、IL-12p40 と CXCL10、MCP-1、RANTES の mRNA 発現は、CpG1668 投与群と比較して有意に上昇した。また、腔組織および腸骨リンパ節での IL-12p40、IL-6、IFN- γ のレベルも有意に高いことが示された。

CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲルによる HSV-2 感染防御

腔分泌液中の HSV-2 力価は、CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲルの投与により有意に減少した。一方、CpG1668 単独または DNA ハイドロゲル単独の場合は HSV-2 力価に有意な変化は認められなかった。腔内投与された CpG DNA は、局所の免疫を Th1 にシフトさせ、マクロファージや樹状細胞を引き寄せることが報告されている。また、Th1 型サイトカインは HSV-2 感染防御に有効であることが示されている。今回の検討から、DNA ハイドロゲルへの搭載による CpG1668 の効果持続が HSV-2 感染防御に有効であるものと考えられる。

以上、本研究では、DNA ハイドロゲルの粘膜への適用可能性の検証を目的とした検討を行い、腔内投与した CpG1668 搭載 DNA ハイドロゲルが持続的に自然免疫を活性化し、HSV-2 感染の防御に有効であることを見出した。

(2) キトサン被覆 DNA ハイドロゲル微粒子の開発

DNA ハイドロゲルの安定性に及ぼすキトサン被覆の影響

蛍光顕微鏡観察の結果、FITC 標識キトサンが DNA ハイドロゲルの表面に局在する様子が認められた。pH 3 の酸性溶液中でインキュベートしたところ、Alexa Fluor488 標識 DNA は 60 分以内に DNA ハイドロゲルから完全に放出されたのに対し、キトサン被覆 DNA ハイドロゲルの場合には有意に遅延した。DNase I 含有溶液の場合も同様の結果が得られた。以上より、DNA ハイドロゲルの酸性環境および分解酵素に対する安定性は、キトサンでの被覆で有意に向上されることが示された。

キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアの作製

蛍光顕微鏡観察の結果、エマルション法で

作製した DNA ハイドロゲルマイクロスフェアの表面にキトサンが局在することが確認された。得られたマイクロスフェアの平均粒子サイズは 30.2 μm であった。

キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアからの CpG1668 の放出

Alexa Fluor488 標識 CpG1668 は効率よくキトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアに搭載可能であり、その効率は 83.3%であった。DNA ハイドロゲルマイクロスフェアに搭載した Alexa Fluor488 標識 CpG1668 を酸性溶液中でインキュベートすると、1 時間までに約 80%が放出されたのに対し、キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアの場合は 4 時間後の放出量はわずか 4%であった。DNase I 含有溶液の場合にも同様の結果となった。

キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアの消化管内挙動

キトサンは粘膜付着性をも有することから、消化管内での滞留時間の延長効果も期待される。そこで最後に、キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアの消化管内挙動を評価した。消化管でほとんど吸収されない FITC-dextran をプローブとして用いることとし、FITC-dextran 内包キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアを調製した。十二指腸内に投与したところ、FITC-dextran 溶液と比較して、FITC-dextran 内包キトサン被覆 DNA ハイドロゲルマイクロスフェアの場合には移動距離が有意に短いことが明らかとなった。

以上より、キトサン被覆 DNA マイクロゲル製剤の開発に成功した。本製剤は、自然免疫を活性化する核酸のほかに、免疫細胞の機能を制御する核酸医薬のデリバリーにも有用であることから、炎症性腸疾患に対する治療システムの開発につながる可能性を示すものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

(1) 齋藤昌朗、野村大貴、菅田謙治、松岡雅雄、高橋洋介、佐野紘平、佐治英郎、高橋有己、高倉喜信、西川元也 . 自然免疫活性化による感染症予防を目的とした CpG DNA 徐放 DNA ハイドロゲルの開発 . 日本核酸医薬学会第 2 回年会 , 2016/11/15-17 , 東京

(2) 野村大貴、高橋有己、高倉喜信、西川元也 . DNA ハイドロゲルを利用した CpG DNA の経膣投与による膣粘膜免疫の持続的活性化 . 日本核酸医薬学会第 1 回年会 , 2015/11/30-12/2 , 京都

(3) 野村大貴、西川元也、高橋有己、高倉喜信 . 経口デリバリーを目的としたキトサン被覆 DNA ハイドロゲル微粒子の開発 . 日本薬剤学会第 30 年会 , 2015/5/21-23 , 長崎

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西川 元也 (NISHIKAWA, Makiya)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号 : 4 0 2 7 3 4 3 7