

令和元年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12876

研究課題名(和文) ナノ粒子による腸管樹状細胞の機能制御

研究課題名(英文) The regulation of intestinal dendritic cell function by nanoparticles

研究代表者

孫 安生 (Son, Aoi)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：30447924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：腸管の免疫系は生体内において最大の免疫器官と言われており、これら免疫細胞の機能を制御することは、様々な疾患の治療につながると注目されている。本研究では、腸管免疫細胞に送達可能なナノ粒子の開発を目的とし、生体適合性に優れたリン酸カルシウムナノ粒子(CaP NPs)を創製した。CaP NPsを用いてマウスマクロファージ細胞細胞株RAW264.7への細胞取り込みを検討した結果、CaP NPsは効率良く細胞に取り込まれた。また、細胞毒性も認められなかったことより、CaP NPsは腸管免疫細胞を標的とした経口ドラッグキャリアとして期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年ナノテクノロジーの発達により、ポリ乳酸やポリグリコール酸を用いた生体分解性ポリマーナノ粒子やリポソームを用いて免疫応答を調節しようという試みが多くなされるようになった。これらのナノ粒子を腸管免疫細胞へデリバリーするための問題点としては、胃や腸の消化酵素に耐性があるかという問題点がある。また、シリカナノ粒子は粒子としての安定性では優れているが、生体への毒性や分解性の欠点がある。本研究では、薬剤を内包し腸管免疫細胞まで送達可能な材料を開発した。本研究で得られたナノ粒子は、投与経路が経口であることから、高齢者や幼児、医療従事者のいない地域での投与も可能であり、医療現場の改革にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：The number of patients of allergic diseases, such as hay fever, has been increasing, however, there is no radical treatment. It is well known that immune system of gut is the largest in the body, so the regulation of the gut immune system could control systemic immune responses.

In this study, we synthesized novel biocompatible Calcium Phosphate nanoparticles (CaP NPs) delivering to immune cells in small intestine. we modified CaP NPs with chitosan or PEI (polyethylenimine). Chitosan has reported it is tolerant to gastric acid. It has been also reported that chitosan can be delivered to Peyer's Patches via oral administration<sup>1</sup>. We observed the efficient uptake of chitosan-modified CaP NPs or PEI-modified Cap NPs to mouse macrophage cell line (RAW267.4) with confocal microscopy. Moreover, cytotoxicity test showed low toxicity. These results suggested that chitosan-modified CaP NPs have a potential to be an oral drug carrier to immune cells in the small intestine.

研究分野：免疫学

キーワード：ナノ粒子 腸管免疫細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

様々なアレルギーの病態において、腸管での免疫システム、特に腸内細菌が関与していることは良く知られている。しかし、アレルギー発症時の腸管樹状細胞に関する詳細な解析はなされておらず、腸管免疫系における特異的な分子機構はまだ不明な点が多い。

腸管における免疫系の維持は、他の生体内における免疫システムとは異なる免疫システムを備えていると考えられており、最近では粘膜免疫の研究も盛んに行われるようになったが、リンパ球や粘膜細胞の多様性からその解析は困難である。中でも病原体から生体を防御する分泌型IgA抗体の誘導や、食物アレルギーのメカニズム、経口ワクチンの開発に関する研究は進んでいるが、喘息やアトピー性皮膚炎などの他臓器でアレルギー症状が見られた時の腸管での病変は未知であり、抗原暴露により生体の免疫細胞が活性化された時、腸管ではどのような変化が起こっているかは報告がない。そこで、アレルギー疾患モデルマウス(アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎など)の腸管から樹状細胞を単離し解析することによって、逆に腸管で活性化された樹状細胞が全身の免疫系にどのような影響を与えるかを調べる。

腸管の免疫系は生体内でも最大の免疫器官と言われており、これらの免疫細胞の機能を制御することは他臓器での免疫応答にも大きく影響を与えられる。本研究においては、それらのアレルギー疾患を臓器別、組織別に捉えるのではなく、各アレルギー疾患を関連付けて考える事により、アレルギーの本質の解明に近づけると考えている。また、粘膜免疫システムの解明は経口免疫寛容を利用したワクチンの開発などに応用されており、将来的には臨床への実用化も予想される。

樹状細胞は免疫応答の司令塔として駆動し、免疫応答の最初の段階で機能する。既存のアレルギー治療は肥満細胞などのエフェクター細胞をターゲットとした対症療法であるのに対して、本研究では、樹状細胞を標的とすることでIgE抗体が産生される前にアレルギー応答を抑制することから、困難とされているアレルギー疾患の根治に繋がると考えられる。また、これまで樹状細胞を標的としたアレルギー治療薬はなく、全身に分布する樹状細胞の中でも腸管樹状細胞に着目した点は、これまでにない。

一方、ナノテクノロジーの発達により、ナノ粒子やリポソームを用いて免疫応答を調節しようという試みが多くなされるようになったが、まだ実用化には至っていない。本研究では、医学・工学の両側面からの知識と技術を集積させ、腸管免疫細胞の機能を制御する新しいマテリアルを開発し、免疫疾患(特にアレルギー性疾患)治療への応用を目指す。本研究が成功すれば、他の免疫細胞や他の組織細胞へのDDS(Drug Delivery System)として応用も可能である。

## 2. 研究の目的

### (1) 新しい生体適合性マテリアルの探索および開発について

腸管樹状細胞に特異的に取り込まれるような新たなマテリアルの要件としては、腸管パイエル板に存在する樹状細胞に選択的にデリバリーできること、胃や腸などの消化器酵素への耐性を有することが重要である。これらの要件をクリアできるナノ粒子を合成する。

### (2) 腸管樹状細胞へのナノ粒子の送達評価

経口投与したナノ粒子が腸管樹状細胞に送達するかどうかを評価する。また、アレルギー疾患モデルマウスの治療効果を評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) ナノ粒子の設計と基本物性評価

経口投与による薬剤のDDSに必要なナノキャリアには、強酸性条件下(胃酸)での安定性や、生体への適合性が求められる。しかしながら、リポソームや合成ポリマーなどの一般的なナノキャリアは、耐酸性に乏しいとされ、そのままでは利用できない。また、シリカナノ粒子はサイズや表面電位などによっては細胞毒性を引き起こすとの報告もある。そこで本研究では、生体内の骨や歯の構成成分であり、生体適合性の高いリン酸カルシウムを選択した。2015年に、腸管内の内在性リン酸カルシウムナノ粒子がM細胞に特異的に取り込まれることが報告された(Powell J.J. et al., Nat. Nanotechnol. 2015, 10:361-369)。よって、人工的に合成したリン酸カルシウムナノ粒子を経口投与した場合、腸管内のM細胞に取り込まれ、パイエル板への送達が期待される。本研究では、まず、リン酸カルシウムナノ粒子(CaP NPs)をコアとして合成し、表面修飾を検討することによって、腸管樹状細胞への送達を目指した。

### (2) 腸管樹状細胞へのナノ粒子の送達評価

まずは、マウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7を用いて*in vitro*でのナノ粒子の細胞への取り込みを評価する。その後、ナノ粒子をマウスへ経口投与し、腸管樹状細胞へ送達可能かを*in vivo*で評価する。

## 4. 研究成果

### (1) ナノ粒子の合成

まず、Morganらにより報告された合成法(Morgan T.T. et al., Nano Letters, 2008, 8(12):4108-4115)に基づき、リン酸カルシウムナノ粒子(CaP NPs)の合成を行った。塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>)と界面活性剤であるIgepal CO-520とをシクロヘキサンに加えたエマルジ

オン1と、リン酸水素ナトリウム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)、ケイ酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>)、蛍光色素であるフルオレセイン、および Igepal CO-520 をシクロヘキサンの加えたエマルジョン2を混合して得られたエマルジョン3からカラムクロマトグラフィーにより、リン酸カルシウムナノ粒子 (CaP NPs) を得た。フルオレセインは薬剤内包を模倣していることと、確認を容易にする目的で用いた。

一般に、リン酸カルシウムナノ粒子の粒径制御は困難であり、粒径の大きい粒子が得られるが、上記の方法により合成したリン酸カルシウムナノ粒子の粒径は約100 nmと小さく、高い水分散性を示した(図1)。また、蛍光色素であるフルオレセイン等の内包も容易であった。一方、合成したCaP NPsの表面電位は負であったことから、細胞への取り込みが困難であることが予想された。そこで、表面修飾剤として、生体適合性が高く、胃酸への耐性を有するキトサン、および遺伝子導入等で用いられるポリエチレンジアミンを選択し、CaP NPsの表面修飾を行った。なお、合成したナノ粒子は、フルオレセインを内包しており、ナノ粒子の細胞への取り込みは、共焦点顕微鏡を用いて確認できた(図2)。また、ポリエチレンジアミンよりも細胞毒性の低いキトサンを表面修飾剤として用いた場合には、細胞毒性の低いナノ粒子を得られたが、細胞への取り込み量は低かった。

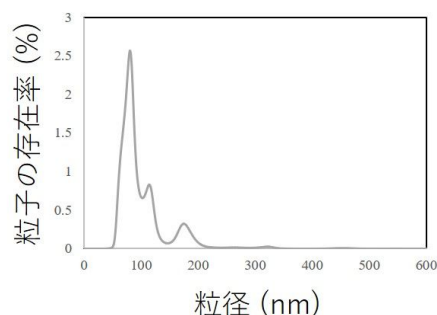


図1 リン酸カルシウムナノ粒子の粒径

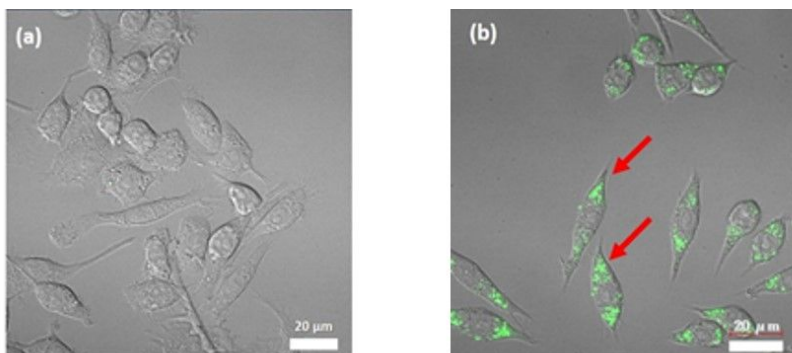


図2 ナノ粒子のマクロファージ細胞株RAW264.7への取り込み

(a) リン酸カルシウムナノ粒子

(b) ポリエチレンジアミン修飾リン酸カルシウムナノ粒子

赤矢印：ナノ粒子

## (2) 腸管樹状細胞へのナノ粒子の送達評価

マクロファージ細胞株を用いた *in vitro* でのナノ粒子の細胞取り込み評価では、ナノ粒子を細胞毒性なく細胞内へ取り込ませることが非常に困難であった。細胞毒性の低いキトサン修飾ナノ粒子をマウスへ経口投与したが、パイエル板や樹状細胞には送達していないことが確認できた。これらの結果は、投与量の問題か、ターゲティングの問題かは解明出来ていない。今後はパイエル板および樹状細胞へのターゲティングが課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

「腸管免疫細胞をターゲットとするナノ粒子の開発とアレルギー性疾患治療法への応用」

孫 安生、石井 拓実、木村 祐、査読無、アレルギーの臨床 vol.38(7)no.515:673-676  
北隆館 (2018)

〔学会発表〕(計3件)

石井 拓実、梅原 由衣、孫 安生、木村 祐、近藤 輝幸

「腸管免疫細胞へのデリバリーを目指したキトサン修飾リン酸カルシウムナノ粒子の合成」

第13回日本分子イメージング学会、2018

石井 拓実、梅原 由衣、孫 安生、木村 祐、近藤 輝幸

「腸管免疫細胞へのデリバリーを目指したキトサン修飾ナノ粒子の合成」

日本化学会 第98春季年会、2018

石井 拓実、梅原 由衣、孫 安生、木村 祐、近藤 輝幸

「腸管免疫細胞にデリバリー可能なリン酸カルシウムナノ粒子の合成」

第7回CSJ化学フェスタ、2017 \*優秀ポスター発表賞受賞

〔図書〕(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 連携研究者

連携研究者氏名：近藤 輝幸

ローマ字氏名：(KONDO, Teruyuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。