

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390370
 研究課題名（和文） 回腸粘膜をターゲットとした画期的適応促進薬・回腸囊炎治療薬の開発
 研究課題名（英文） Development of an innovative drug targeting the ileal mucosa to promote intestinal adaptation and to treat pouchitis
 研究代表者 福島 浩平（FUKUSHIMA KOUHEI）
 東北大学・大学院医工学研究科・教授
 研究者番号：20271900

研究成果の概要（和文）：

薬剤を効率よく目的とする組織や細胞に送り込み、最大の効果と最小の副作用を実現するのがドラッグデリバリーシステムである。ポリ乳酸・グリコール酸は生体に無害で薬剤に運び屋として利用できる。難病である潰瘍性大腸炎術後の下痢や小腸の炎症を治療するために、ポリ乳酸・グリコール酸にしみ込ませた薬剤がどの細胞にどれだけ届くのかを解明する仕組みを作り上げた。口から内服しただけでは十分吸収されないため、何らかの工夫が必要である。

研究成果の概要（英文）：

Drug delivery system is defined as the method which enables to efficiently bring drugs to target tissues or cells, resulting in therapeutic effects at most and side effects at least. Poly lactic/glycolic acids are harmless and available as a drug carrier. We established the methods to evaluate distribution of drug-incorporated PLGA particles, release of drugs, and effects of drugs on target and non-target cells. Because oral administration of PLGA particles failed to be absorbed in GI mucosa, modification of the particle surface may be required.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：外科系臨床医学・消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：回腸囊炎、潰瘍性大腸炎、intestinal adaptation

1. 研究開始当初の背景

(1) Intestinal adaptation の限界と回腸囊炎：潰瘍性大腸炎に対する大腸全摘回腸囊肛門吻合術後の残存小腸の適応現象 (Intestinal adaptation) には限界があり、水溶性下痢をきたし容易に脱水や電解質失調を招来する。

(2) 大腸全摘術後の Intestinal adaptation

の機序：中心は、血中アルドステロンの上昇と残存小腸上皮細胞における機能分子の誘導である。

(3) 新しい Drug delivery system を用いた大腸全摘術後の適応促進：ポリ乳酸微粒子のシステムにより回腸粘膜選択的に高濃度の薬物輸送が可能である。

(4) PPAR γ アゴニストの新展開：PPAR γ は

retinoid X receptor α (RXR α) とヘテロダイマーを形成し、peroxisome proliferator response elements (PPRE) に結合して NF- κ B、c-Jun、c-Fos などの炎症性シグナルを制御し IL-1 β 、TNF- α 、ケモカインの分泌を抑制する。また、腎尿細管では PPAR \cdot アゴニスト投与により PPAR \cdot が活性化され、ENaC (特に ENaC γ -subunit の誘導) を介し Na 吸収の増加が起こり体液の貯留を来す。

2. 研究の目的

(1) PPAR γ アゴニストである TZD 誘導体を結合した PLGA ポリ乳酸 TZD 誘導体を作製し、潰瘍性大腸炎に対する大腸全摘術後の Intestinal adaptation 促進薬、回腸囊炎治療薬としての臨床応用へ向け、動物実験を中心とした前臨床段階の基礎的検討を行うこと。

(2) 本薬剤を用いた臨床試験を計画しその準備を行うこと。

3. 研究の方法

(1) PLGA 製剤の薬剤分布の検討

ポリ乳酸マイクロ微粒子の経口投与時に最も重要なことは、標的細胞に治療効果を得るのに十分な薬剤濃度が合到達しているのか否かである。模擬薬剤として Hoechst 33342 を含む PLGA 粒子を作製した。また、細胞核染色強度と Hoechst 33342 濃度の相関を明らかにした。さらに、経口投与、静脈投与、腹腔内投与を行い粒子の分布、薬剤の放出について検討した。

(2) 小腸および大腸上皮細胞株に対する TZD 誘導体の *in vitro* におけるナトリウム吸収分子発現に対する効果

大腸癌上皮細胞株 Caco2、HT29/B6、T84、小腸上皮細胞株 IEC6 の PPAR γ ・RXR α 発現を検討する。TZD 誘導体により刺激し、経時的に ENaC α 、 β 、 γ -subunit、prostasin、mineralocorticoid receptor、11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type2、SGLT1 の発現を mRNA レベルで検討した。

(3) 単球および大腸上皮細胞株に対する TZD 誘導体の *in vitro* における抗炎症効果と Hoechst 33342 の影響

PLGA 粒子に実際の薬剤 (TZD 誘導体) 模擬薬剤 (Hoechst 33342) をともに含有させることを想定して実験を行った。U937 にそれぞれ DMSO、ピオグリタゾン (100 μ M)、Hoechst 33342 (1 μ g/ml)、ピオグリタゾン・Hoechst 33342 併用 (100 μ M・1 μ g/ml) を加えて 24

時間培養し、更に 10 μ g/ml のリポポリサッカライド (LPS) にて 3 時間刺激した後、マルチプレックス RT-PCR を行い、IL-1 β および TNF- α の mRNA の発現量を検討した。

4. 研究成果

(1) 模擬薬剤を用いた粒子吸収と薬剤分布の検討

① Hoechst 33342 の細胞障害性について Hoechst 33342 低濃度培養 (1 μ g/ml 以下) では、12 日間の培養で著しい細胞障害性は観察されなかった。しかし、5 μ g/ml では 24 時間でほとんどすべての細胞が細胞接着性を喪失し、アポトーシスを起こしているものと推察された。この現象は、IEC6 および U937 細胞を用い MTT アッセイでも確認された。

② Hoechst 33342 濃度と染色強度について細胞数 1000 個当たりの蛍光強度についてみると、蛍光強度は Hoechst 33342 濃度依存性であり 1 μ g/ml ではほぼプラトーに達すると考えられた。組織学的観察を想定し細胞固定の影響についてみると、同じ濃度で固定処置の前後で比較では固定後で蛍光強度が減弱することはなく、0.1 μ g/ml の濃度ではむしろ固定後に蛍光強度が増加した。フローサイトメーターで解析すると、上皮性の IEC-6 および単球系の U-937 とともに Hoechst 33342 の濃度の増加に伴って細胞数のピークが右方向に移動し半定量性が認められた。

③ マウスを用いた *in vivo* における検討 投与経路にかかわらず、粒子取り込みの見られた組織では粒子周囲に核染色性が認められた。染色強度についてみると、粒子により近い部位ではより強い染色性が認められたが、次第に減弱し粒子から約 50 μ m 以遠での染色性はほぼ認められなかった。腹腔内単核球の時間経過と Hoechst 33342 染色性について、フローサイトメーターにて解析した。コントロール粒子では、すべての細胞で蛍光は認めらななかったのに対し、Hoechst 33342 含有 PLGA 粒子投与マウスでは 20 時間後にピークが左方に移動し、60 時間後にはさらに左方に移動した。すなわち、時間経過とともに強く染色される細胞数が増加することが示され、Hoechst 33342 の粒子からの放出が時間依存性であることが推測された。このような模擬薬剤を用いて、実際の投与開始機に対応させながら、薬剤の放出速度を推測したり、標的および非標的細胞をラベルあるなしで識別しさらなる解析につなげる手

法は初めてのものである。

(2) 小腸および大腸上皮細胞株に対するTZD誘導体の *in vitro* におけるナトリウム吸収分子発現に対する効果について検討したが、細胞株では、十分量の発現、さらには発現量の変化を見出すことができなかった。In vivo の系で試みたが、PLGA 粒子が実際には経口投与では、粘膜に十分量が移行しないことが明らかとなった。したがって、PLGA 粒子の表面修飾などにより粘膜意向性を高める工夫が不可欠である。

(3) 単球および大腸上皮細胞株に対するTZD誘導体の *in vitro* における抗炎症効果についてみると、IL-1 β やLPSなどの刺激に際して炎症性サイトカインの発現を抑える方向で働いた。回腸粘膜に十分量の薬剤が選択的に到達し得れば、抗炎症作用を発揮しうる可能性が示唆された。

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15件)

1. M. Hinata, A. Kohyama, K. Fukushima, et al. A shift from colon- to ileum-predominant bacteria in ileal-pouch feces following total proctocolectomy. *Dig Dis Sci* 2012 (印刷中) (査読有) (11人中11番目)
2. T. Watanabe, K. Fukushima et al. Interval of less than 5 years between the first and second operation is a risk factor for third operation for Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease* 18: 17-24, 2012 (査読有) (7人中4番目)
3. 福島浩平、小川 仁、佐々木巖ほか 難治性回腸の炎の病態と治療 胃と腸 46: 2003-2008, 2011 (査読無) (14名中1番目)
4. 福島浩平、小川 仁、日當愛美、小森佑奈、佐々木佳織、佐々木巖ほか 回腸囊炎の病因・病態と腸内細菌叢 *IBD Research* 4: 89-96, 2010 (査読無) (11人中1番目)
5. A. Kohyama A, K. Fukushima, et al. Bacterial population moves toward a colon-like community in the pouch after total proctocolectomy. *Surgery* 145: 435-447, 2009 (査読有) (9人中9番目)
6. K. Watanabe, K. Fukushima et al. Hand-assisted laparoscopic vs. open subtotal colectomy for severe ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 52: 640-645, 2009 (査読有) (6人中3番目)
7. 福島浩平、小川 仁、佐々木巖ほか 回腸囊炎の診断と臨床経過-初期病変の診断

を目指して胃と腸 44: 1568-1573, 2009 (査読無) (11人中1番目)

8. H. Shiga, S. Takagi, K. Fukushima et al. What determines the later clinical course of patients who do not undergo colectomy at the first attack? A Japanese cohort study on ulcerative colitis. *Digestion* 81: 104-112, 2009 (査読有) (12人中10番目)
9. K. Takahashi, Y. Funayama, K. Fukushima, et al. Ileal J-pouch perforation at the blind end: report of a case. *Surg Today* 39: 780-786, 2009 (査読有) (6人中3番目)
10. M. Nagao, C. Shibata, Y. Funayama, K. Fukushima, et al. The effect of a total colectomy on the motor inhibition of the upper gut induced by intra-ileal stimuli in conscious dogs. *Surg Today* 39: 780-786, 2009 (査読有) (10人中4番目)

[学会発表] (計9件)

1. 平嶋 均、福島浩平ほか 消化器系ストーマ感染起因菌の分子生物学的解析 第29回ストーマリハビリテーション学会 2012年2月4日 郡山
2. 福島浩平ほか 大腸全摘術後回腸囊の腸内細菌叢の変動 第66回日本大腸肛門病学会 2011年11月25日 東京
3. 日當愛美、福島浩平ほか 潰瘍性大腸炎に対する大腸全摘術後の腸内細菌叢の変動 第15回腸内細菌学会 2011年6月16日 東京
4. 小森佑奈、福島浩平ほか Differential Displayによる腸内細菌mRNA解析の試み 第15回腸内細菌学会 2011年6月16日 東京
5. 羽根田祥、福島浩平ほか はちみつ摂取による便中腸内細菌叢への影響 第15回腸内細菌学会 第15回腸内細菌学会 2011年6月16日 東京
6. 佐々木佳織、福島浩平ほか 消化管を標的としたドラッグデリバリーシステムの検証と応用 第87回 日本消化器病週間 2010年10月21日 横浜
7. 福島浩平 大腸全摘術後の小腸上皮細胞の機能変化 第87回 日本生理学会 2010年5月21日 盛岡
8. 福島浩平 Critical issues left behind after total proctocolectomy for ulcerative colitis. Annual Meeting of CHINESE JOURNAL OF BASES AND CLINICS IN GENERAL SURGERY 2009年6月15日 中国、成都

[図書] (計2件)

1. 福島浩平ほか 南江堂 リハビリスタック

- フに求められる薬・栄養・運動の知識 小腸機能障害 2010年 212-220
2. 福島浩平ほか 京都大学出版会 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス 炎症性腸疾患とプロバイオティクス 2010年 521-526

[その他]

ホームページ等

<http://www.surg1.med.tohoku.ac.jp/class/molecule.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 浩平 (FUKUSHIMA KOUHEI)
東北大学・大学院医工学研究科・教授
研究者番号：20271900

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：