

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19947

研究課題名（和文）ポリアミンナノ粒子による腸管微小環境ネットワークの制御と炎症性腸疾患治療への応用

研究課題名（英文）Regulation of intestinal microenvironment networks by polyamine nanoparticles and its application to the treatment of inflammatory bowel disease

研究代表者

西口 昭広（NISHIGUCHI, Akihiro）

国立研究開発法人物質・材料研究機構・高分子・バイオ材料研究センター・主幹研究員

研究者番号：10784944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は、腸管免疫の異常亢進によって下痢や血便を引き起こす難治性の自己免疫疾患であるが、既存の薬物療法では治療効果が不十分であり、全身性の副作用が問題である。本研究では、腸管微小環境ネットワークを制御するポリアミンナノ粒子を開発し、炎症性腸疾患治療へ応用することを目的とした。抗炎症機能を有するポリアミンとヒアルロン酸からなるポリアミンナノ粒子を開発し、分子構造とROSスカベンジング機能の関係を明らかにし、腸管微小環境ネットワークを制御するナノ粒子を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、潰瘍性大腸炎の治療薬として経口投与可能な抗炎症性ポリアミンナノ粒子を開発した。高い生体適合性と活性酸素消去活性を持つポリアミンをベースとしたナノメディンは、炎症性疾患の治療のための抗炎症薬として有用であると期待される。

研究成果の概要（英文）：Inflammatory bowel diseases including ulcerative colitis and Crohn's disease are intractable autoimmune diseases causing diarrhea and bloody stools due to abnormal enhancement of intestinal immunity. Conventional drug therapies have systemic side effects. We aimed to develop polyamine nanoparticles that regulate the intestinal microenvironmental networks and apply them to the treatment of inflammatory bowel disease. Polyamine nanoparticles composed of polyamine and hyaluronic acid with anti-inflammatory functions were developed. The relationship between molecular structure and ROS scavenging function was clarified to develop nanoparticles that control the intestinal microenvironmental networks.

研究分野：生体材料学、高分子化学

キーワード：ポリアミン 免疫制御 炎症性疾患 ナノ粒子 生体適合性

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患は、腸管免疫の異常亢進によって下痢や血便を引き起こす難治性の自己免疫疾患であり、国内患者数は16万人に上る。生涯にわたって治療が必要であるが、抗炎症薬やステロイド薬、生物学的製剤などの既存の薬物療法では治療効果が不十分であり、全身性の副作用が問題である (Inflamm. Bowel Dis. 2015, 21, 182)。

腸管は粘膜層・免疫細胞・腸内細菌叢・神経組織などからなる独自の微小環境を形成し、その恒常性を維持しており、恒常性の破綻は、炎症性腸疾患やがんを引き起こす。そのため、腸管微小環境ネットワークの分子機序を理解し制御できれば、炎症性腸疾患の根治につながる要素技術が開発できる。

2. 研究の目的

本研究では、腸管微小環境ネットワークを制御するポリアミンナノ粒子 (polyamine nanoparticles, PANPs) を開発し、炎症性腸疾患治療へ応用することを目的とする。ポリアミンは、生物の体内に存在する生理活性分子群であるが、作用機序は不明な点が多い。申請者は、ポリアミンの一種であるオリゴエチレンイミンが、酸化ストレスの原因となる活性酸素 (Reactive Oxygen Species, ROS) を除去 (スカベンジング) することで、免疫細胞に対して抗炎症機能を発現することを見出している (A. Nishiguchi et al., Adv. Funct. Mater., 2021, 31, 2100548)。この独自技術を基に、抗炎症機能を有するヒアルロン酸 (HA) とポリアミンを用いた PANPs を開発し、分子構造と ROS スカベンジング機能の関係を明らかにし、腸管微小環境ネットワークを制御するナノ粒子を探索する。PANPs は、ROS スカベンジング機能によって、炎症の原因物質である酸化ストレスを除去することで炎症性腸疾患の治療に寄与すると期待される。

3. 研究の方法

PANPs の作製

PANPs は、有機溶媒中での HA の自己組織化と PA との架橋によって調製された。HA 水溶液に有機溶媒としてエタノールを添加し、縮合剤である EDC と NHS を添加することで、PANPs を作製した (Figure 1a)。

PANPs の抗炎症機能評価

次に、PANPs の抗炎症機能を評価するために、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 とマウス骨髄由来マクロファージ (BMDMs) を用いた。予めプレート上で培養した RAW264.7 に対して 100、140、340-PANP を添加し、24 時間培養後に WST-8 アッセイによって細胞生存率を評価した。また、マクロファージをリポ多糖 (LPS) によって刺激し、NF- κ B の活性化と遺伝子発現、TNF- α の産生を定量した。

PANPs のターゲティング能と治療効果の評価

PANPs の組織ターゲティング能を評価するために、組織学的観察と *in vivo* 蛍光イメージングを行った。マウスに 3% DSS を 5 日間自由飲水させ、潰瘍性大腸炎を誘発した。1 日間水を飲ませた後、Cy5.5 標識 100-PANPs を経口投与し、大腸粘膜組織内での分布を観察した。また、PANPs を DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルに経口投与し、その治療効果を評価した。これまでの報告では、DSS と薬剤を同時に投与した予防的炎症モデルを用いることが多かったが、本実験では 5 日間の DSS 投与後に PANPs を投与する治療モデルを用いて評価を行った。

4. 研究の成果

PANPs の構造観察

PANPs の調製条件を最適化するために、いくつかの有機溶媒をスクリーニングした結果、エタノールを使用すると単分散の PANPs が形成されたが、アセトンを使用すると凝集が起こり、2-プロパノールを使用するとマイクロメートルサイズの粒子が形成された。ナノメートルサイズの粒子が潰瘍性大腸炎を効果的にターゲティングできるため、有機溶媒としてエタノールを用いた (Figure 1b)。さらに、比較的低分子量の PA (bOEI300) は凝集を示し、ナノ粒子形成には bOEI600 が適していた。

PANPs 中のアミノ基の量は、100、140 および 340 $\mu\text{mol/g}$ の範囲で制御可能であり、それぞれ異なる量のアミノ基を持つ PANPs (100、140 および 340-PANPs) を作製した。動的光散乱測定の結果、100、140、340-PANP の平均直径はそれぞれ 620、300、430 nm であった。また、PANPs の ROS 除去機能を評価するために、残存ヒドロキシラジカルが検出可能な DCF アッセイを行った。その結果、すべての PANPs がヒドロキシラジカルの発生を抑制し、高い活性酸素消去能を示した。

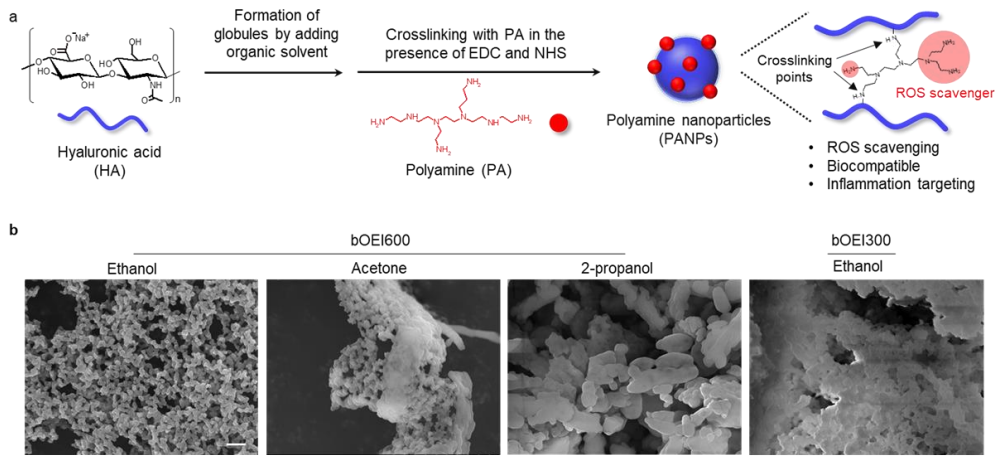


Figure 1. (a) Schematic illustration of the preparation of polyamine nanoparticles (PANPs). (b) Scanning electron microscopy (SEM) images of PANPs prepared using different organic solvents (ethanol, acetone, and 2-propanol) and molecular weights (300 and 600 Da) of bOEI.

PANPsの抗炎症機能

WST-8 アッセイによって PANPs の細胞生存率を評価した結果、すべての PANPs は、2.5 mg/mL 以下で高い細胞適合性を示した (Figure 2a)。PANPs の抗炎症機能を評価するため、RAW264.7 を LPS で活性化し、核内因子 κ B (NF- κ B) の核内移行を定量した。哺乳類の NF- κ B ファミリーは、p50、p52、RelA (p65)、RelB、c-Rel を含み、I κ B (I κ B) と不活性化複合体を形成し、免疫応答の重要な調節因子として機能している。toll 様受容体を介した炎症シグナルに反応して、I κ B キナーゼ (IKK) 複合体が I κ B のリン酸化を開始し、NF- κ B の核内転座を受け、炎症関連遺伝子の転写につながる。炎症評価試験において、PANPs は、RAW264.7 細胞における NF- κ B の活性化と核内移行を大幅に抑制した (Figure 2b)。また、PCR を用いた遺伝子発現アッセイにより、PANPs はインターロイキン-1 β (IL-1 β) や TNF- α など、様々な炎症関連因子の遺伝子発現を抑制することが明らかになった (Figure 2c)。BMDM から分泌される TNF- α の産生を ELISA で定量したところ、100-PANPs および 140-PANPs は、コントロールおよび 340-PANPs よりも TNF- α 産生を抑制した (Figure 2d)。LPS は TLR4 に結合し、NF- κ B の核内移行を介して IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインの遺伝子発現を活性化する。PANPs は、過剰な細胞内外の活性酸素を消去することにより、IKK の機能、I κ B α の分解、NF- κ B の核内移行、DNA への結合を阻害することで、NF- κ B の核内移行を抑制すると考えられる。これらの実験結果は、bOEI を結合させたヒアルロン酸の結果と関連しており、PANPs においても bOEI の抗炎症機能が維持されていることが示された。

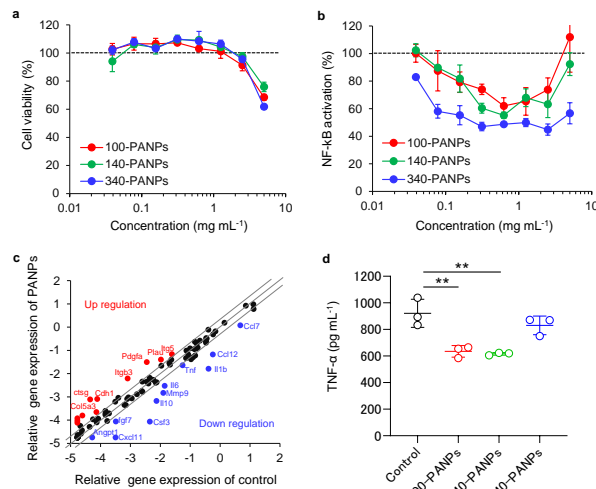


Figure 2. (a, b) Cell viability and nuclear factor (NF)- κ B activation of RAW264.7 cells exposed to lipopolysaccharides (LPS; 100 ng/mL) or LPS and PA or PANPs ($n = 3$). (c) Scatter plot of the expression levels of inflammation-related genes in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) exposed to LPS (100 ng/mL) or LPS and PANPs (1 mg/mL). (d) Secretion of tumor necrosis factor (TNF)- α from BMDMs exposed to LPS (100 ng/mL) or LPS and PANPs (1 mg/mL).

PANPsのターゲティング能と治癒効果

DSSを投与すると、強い炎症反応により下痢や潰瘍形成、顆粒球浸潤が起こる。切片化した大腸組織の蛍光画像から、100-PANPsが粘膜表面に集積していることがわかったが、Cy5.5-HAを投与した場合は、速やかにクリアランスされ粘膜上に蛍光は認められなかった (Figure 3a)。一方、DSSを投与しなかったマウスの正常結腸では、100-PANPsは集積していなかった。潰瘍性大腸炎では、腸のバリアが破壊され、経口投与された薬物のバリア越しの透過がサイズに応じて促

進され、ナノ粒子は低分子に比べて炎症組織に効果的に蓄積することが知られており、PANPs もそのサイズ効果によって集積したと予想される。また、炎症を起こした粘膜はトランスフェリンのようなプラスに帯電したタンパク質で覆われているため、静電相互作用によるターゲティングも可能である。したがって、負に帯電した PANPs は静電相互作用を介して損傷した粘膜層をターゲットに送達効果を向上させることができると考えられる。これらの結果は、ポリマーから bOEI と HA をナノ粒子化することで、炎症組織へのターゲティング能を向上させることができることを示している。

最後に、潰瘍性大腸炎モデルマウスに対する 100-PANPs の治療効果を評価した。潰瘍性大腸炎の実験に先立ち、100-PANPs の生体適合性をマウスで評価した。100-PANPs を経口投与すると、高用量（治療実験の 10 倍量）でもマウスの体重に変化はなかった。心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、結腸の組織を組織学的に観察したところ、重篤な損傷、出血、壊死は認められなかった。また、血液検査の結果、100-PANPs は白血球、赤血球、肝臓および腎臓の機能に関連する生物学的成分に変化を起こさなかった。これらの結果は、経口投与された 100-PANP に重篤な全身毒性がないことを示している。

次に、PANPs を DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルに経口投与し、その治療効果を評価した (Figure 3b)。その結果、DSS を自由飲水したマウスでは、10 日目に体重が約 80% まで減少した。一方で、PANPs を投与したマウスの体重は 7 日目以降に回復し、特に、100-PANPs を投与したサンプルは 10 日目に 90% 以上に達した (Figure 3c)。これらの PANPs は、潰瘍性大腸炎治療薬として市販されている 5-ASA よりも高い体重回復率を示した。5-ASA は潰瘍性大腸炎に広く使用されているが、その治療効果は限定的であることが多く、腹痛、脱毛、アレルギー反応などの標的外副作用を引き起こす。また、未処理のマウスでは、重度の炎症により腸管が肥厚し、大腸が短くなったが、100-PANPs は DSS による大腸の短縮を抑制していた。さらに、採取した大腸組織の ELISA では、100-PANPs 投与マウスで炎症性サイトカインである IL-6 の分泌が抑制されていた。これらの結果は、抗炎症作用のある PANPs を投与することで、炎症反応が抑制され、大腸障害が抑制されることを示している。さらに、HE 染色による組織学的評価においては、PBS 投与マウスでは腸管バリア構造の破壊と炎症細胞の浸潤が認められたが、PANPs 投与マウスでは強い炎症反応は確認されなかった。これは、経口投与された PANPs が炎症を起こした腸結腸粘膜に局在し、過剰な活性酸素を効果的に消去することで、マクロファージの炎症反応を抑制したためであると考えられる。つまり、抗炎症性 PANPs は大腸の炎症反応を抑制する機能を有しており、潰瘍性大腸炎治療に有用であることを示唆している。

本研究では、潰瘍性大腸炎の治療薬として経口投与可能な活性酸素消去 PANPs を開発した。高い生体適合性と活性酸素消去活性を持つポリアミンをベースとしたナノメディンは、炎症性疾患の治療のための抗炎症薬として有用であると期待される。

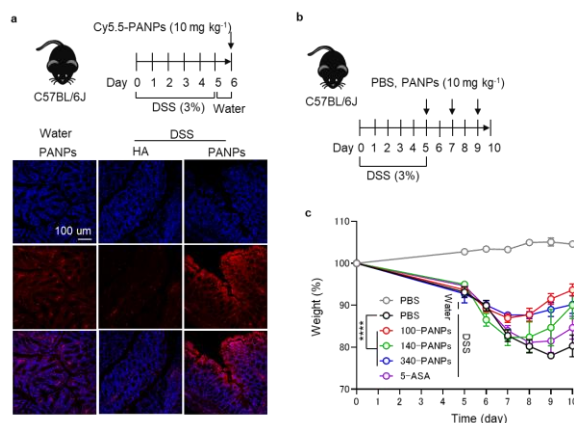


Figure 3. (a) Mice (C57BL/6J) were provided water or 3% dextran sulfate sodium (DSS)-containing water for 5 d. After 1 d of providing with water, mice were orally administered Cy5.5-HA (10 mg/kg) and Cy5.5-labeled 100-PANPs (10 mg/kg). Tissues were collected 6 h after administration. (b) Mice (C57BL/6J) were provided water or 3% DSS-containing water for 5 d and orally administered PBS, PANPs (10 mg/kg), and 5-aminosalicylic acid (5-ASA; 10 mg/kg) on days 5, 7, and 9. (c) Changes in daily body weight for 10 d (n = 4).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishiguchi Akihiro, Taguchi Tetsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Inflammation-targeting polyamine nanomedicines for the treatment of ulcerative colitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 4005 ~ 4013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D3TB00424D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西口昭広、田口哲志	4. 巻 38
2. 論文標題 生体機能化ポリマーによる免疫細胞機能制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 379-387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------