

めて増加しており、さらにこれらの細胞は IL-12 などの炎症性サイトカインを産生することを明らかにした。そこで、正常マウスの細胞がサイトカイン産生を示さない分子機構を、正常マウスと IL-10 ノックアウトマウスの細胞間で遺伝子発現の差を DNA microarray で解析し、核に発現する I κ B 分子 I κ BNS が、正常マウスの細胞に選択的に発現していることを見いだした。I κ BNS をマクロアージ系細胞株に発現させると、LPS 刺激による TNF- α 産生は抑制しないが、IL-6 産生を抑制することを見いだした。そこで、I κ BNS の生理機能を明らかにし、この個体レベルでの役割を明らかにするため、ノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に 1 回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

I κ BNS ノックアウトマウスは正常に出生し、外見上異常は認めなかった。I κ BNS ノックアウトマウスより腹腔マクロファージを単離、あるいは骨髓由来樹状細胞を分化させ、TLR 刺激による TNF- α 、IL-6、IL-12 産生を解析した。その結果、I κ BNS ノックアウトマウスでは、TNF- α 産生に変化はないが、IL-6、IL-12 産生が有意に亢進していた。次にこれら遺伝子の mRNA の発現誘導を real time RT-PCR 法で解析した。TNF- α mRNA の誘導は刺激後 1 時間以内に認められるが、この誘導パターンには正常マウスと I κ BNS ノックアウトマウス間で変化はなかった。IL-6 mRNA は刺激後 3 時間から誘導がみられるが、3 時間まで

は両マウス間で差はなかった。正常マウスでは 3 時間以降 mRNA の発現量は低下するが、I κ BNS ノックアウトマウスでは mRNA 量は高いままであった。他の遺伝子にも刺激後 1 時間以内の早期に誘導されてくる遺伝子 (IL-1 β , IL-12p19 など) と遅れて時間以後に誘導される遺伝子 (IL-12p40, IL-18 など) があるが、早期に誘導される遺伝子群の発現誘導パターンは両マウス間で差がないが、遅れて誘導されてくる遺伝子群は 5 時間以降 I κ BNS ノックアウトマウスで有意に発現が高かった。次に、TLR 刺激によるまた TLR 刺激による NF- κ B の活性化をゲルシフト法、および NF- κ B p65 の細胞内局在により解析した。その結果、I κ BNS ノックアウトマウスでは NF- κ B の活性が遷延化し、刺激後 3 時間でもまだ NF- κ B の活性が残存していることが明らかになった。次に、TNF- α 、IL-6 プロモーターへの NF- κ B p65 の会合をクロマチン免疫沈降法で解析した。TNF- α プロモーターへの p65 の会合は刺激後 1 時間をピークに観察され、これは正常マウスと I κ BNS ノックアウトマウス間で差は認められなかった。一方 IL-6 プロモーターへの p65 の会合は刺激後 3 時間をピークに正常マウスでは認められた。I κ BNS ノックアウトマウスでも 3 時間までは正常マウスと同様に p65 の会合が誘導されたが、3 時間以降正常マウスでは p65 の会合が減少していくのに対し、I κ BNS ノックアウトマウスでは持続したままであった。これらの結果から、I κ BNS は刺激後遅れて誘導されてくる遺伝子のプロモーターにおいて選択的に NF- κ B の活性を抑制することにより、遺伝子発現を抑制していることが明らかになった。さらに個体レベルでも、LPS 投与によるエンドトキシシヨックに対する感受性が高くなり、また dextran sodium sulfate の経口投与による腸管炎症に対する感受性も極めて高くなっていた。

D. 考察

以上の結果から、核に発現する IκBNS が、自然免疫系の細胞において NF-κB の活性を抑制することにより、あるサブセットの遺伝子発現を抑制し、個体レベルで炎症抑制に関与していることが明らかになった。今後も、自然免疫系の活性制御機構を解析し、その制御技術基盤を確立し、有効なアジュバントの創出に寄与したい。

E. 結論

大腸の粘膜固有層に局在する自然免疫系細胞は、TLR 刺激に応答しない。そしてその不応答機構の破綻が慢性炎症性腸疾患の発症のトリガーとなりうる。正常では、核に発現する IκB 分子 IκBNS が選択的に TLR 刺激依存性のサイトカイン産生を負に制御し、過剰な炎症の誘導を抑制している。

F. 研究成果

1. 論文発表

1. Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsu, T., Koga, R., and Takeda, K.: IκBNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation. *Immunity* 24, 41-51 (2006).
2. Ogawa, A., Tagawa, T., Nishimura, H., Yajima, T., Abe, T., Arai, T., Taniguchi, M., Takeda, K., Akira, S., Nimura, Y., and Yoshikai, Y.: Toll-like receptors 2 and 4 are differentially involved in Fas-dependent apoptosis in Peyer's patch and liver at an early stage after bile duct ligation in mice. *Gut* 5, 105-113 (2006).
3. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
4. Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.: Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 6, 1087-1095 (2005).
5. Wieland, C. W., Florquin, S., Maris, N. A., Hoebe, K., Beutler, B., Takeda, K., Akira, S., and van der Poll, T.: The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable *Haemophilus influenzae* from the mouse lung. *J. Immunol.* 175, 6042-6049 (2005).
6. Yukawa, K., Tanaka, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Bai, T., Maeda, M., Takeda, K., Akira, S., and Iso, H.: Reduced prepulse inhibition of startle in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 16, 673-675 (2005).
7. Matsukawa, A., Kudo, S., Maeda, T., Numata, K., Watanabe, H., Takeda, K., Akira, S., and Ito, T.: Stat3 in resident macrophages as a repressor protein of inflammatory response. *J. Immunol.* 175, 3354-3359 (2005).
8. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S.:

- Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28 (2005).
9. Ohkawara, T., Takeda, H., Nishihira, J., Miyashita, K., Nihiwaki, M., Ishiguro, Y., Takeda, K., Akira, S., Iwanaga, T., Sugiyama, T., and Asaka, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to the development of acute dextran sulphate sodium-induced colitis in Toll-like receptor 4 knockout mice. *Clin. Exp. Immunol.* 141, 412-421 (2005).
 10. Weiss, D. S., Takeda, K., Akira, S., Zychlinsky, A., and Moreno, E. : MyD88, but not Toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 73, 5137-5143 (2005).
 11. Yang, S., Takahashi, N., Yamashita, T., Sato, N., Takahashi, M., Mogi, M., Uematsu, T., Kobayashi, Y., Nakamichi, Y., Takeda, K., Akira, S., Takada, H., Udagawa, N., and Furusawa, K. : Muramyl dipeptide enhances osteoclast formation induced by lipopolysaccharide, IL-1b, and TNF-a through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
 12. Shindou, H., Ishii, S., Yamamoto, M., Takeda, K., Akira, S., and Shimizu, T. : Priming effect of lipopolysaccharide on acetyl-coenzyme A: lyso-platelet-activating factor acetyltransferase is MyD88 and TRIF independent. *J. Immunol.* 175, 1177-1183 (2005).
 13. Kitching, A. R., Turner, A. L., Wilson, G. R., Semple, T., Odobasic, D., Timoshanko, J. R., O'sullivan, K. M., Tipping, P. G., Takeda, K., Akira, S., and Holdsworth, S. R. : IL-12p40 and IL-18 in crescentic glomerulonephritis: IL-12p40 is the key Th1-defining cytokine chain, whereas IL-18 promotes local inflammation and leukocyte recruitment. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 2023-2033 (2005).
 14. Yang, R., Murillo, F. M., Delannoy, M. J., Blosser, R. L., Yutzy, W. H. 4th, Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Viscidi, R. P., Roden, R. B. : B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. *J. Immunol.* 174, 7912-7919 (2005).
 15. Yang, R., Wheeler, C. M., Chen, X., Uematsu, S., Takeda, K., Akira, S., Pastrana, D. V., Viscidi, R. P., and Roden, R. B. : Papillomavirus capsid mutation to escape dendritic cell-dependent innate immunity in cervical cancer. *J. Virol.* 79, 6741-6750 (2005).
 16. Xu, A. W., Kaelin, C. B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M. W., and Barsh, G. S. : PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J. Clin. Invest.* 115, 951-958 (2005).
 17. Yukawa, K., Iso, H., Tanaka, T., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M. : Down-regulation of dopamine transporter and

- abnormal behavior in STAT6-deficient mice. *Int. J. Mol. Med.* 15, 819-825 (2005).
18. Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E. P., Takegahara, N., Marukawa, S., Ishida, I., Morishita, H., Prasad, D. V., Tamura, M., Mizui, M., Toyofuku, T., Akira, S., Takeda, K., Okabe, M., and Kikutani, H.: Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: Defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305-316 (2005).
 19. Hirotsu, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and Takeda, K.: The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria. *J. Immunol.* 174, 3650-3657 (2005).
 20. Araki, A., Kanai, T., Ishikura, T., Makita, S., Uraushihara, K., Iiyama, R., Totsuka, T., Takeda, K., Akira, S., and Watanabe, M.: MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J. Gastroenterol.* 40, 16-23 (2005).
 21. Kamezaki, K., Shimoda, K., Numata, A., Haro, T., Kakumitsu, H., Yoshie, M., Yamamoto, M., Takeda, K., Matsuda, T., Akira, S., Ogawa, K., and Harada, M.: Roles of Stat3 and ERK in G-CSF Signaling. *Stem Cells* 23, 252-263 (2005).
 22. Yukawa, K., Kishino, M., Goda, M., Liang, X. M., Kimura, A., Tanaka, T., Bai, T., Owada-Makabe, K., Tsubota, Y., Ueyama, T., Ichinose, M., Maeda, M., Takeda, K., and Akira, S.: STAT6 deficiency inhibits tubulointerstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 225-230 (2005).
 23. Akamine, M., Higa, F., Arakaki, N., Kawakami, K., Takeda, K., Akira, S., and Saito, A.: Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in in vitro responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 352-361 (2005).
 24. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
 25. Yukawa, K., Kishino, M., Hoshino, K., Shirasawa, N., Kimura, A., Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Bai, T., Tanaka, T., Ueyama, T., Ichinose, M., Takeda, K., Akira, S., and Maeda, M.: The kinase domain of death-associated protein kinase is inhibitory for tubulointerstitial fibrosis in chronic obstructive nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 15, 73-78 (2005).
 26. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem.*

- AIAA. 4, 3-11 (2005).
27. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
 28. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
2. 学会発表
1. Kiyoshi Takeda, The roles of STATs in inflammatory responses: Lessons from the knockout mouse. (symposium, invited), American Thoracic Society 2005, 2005.5-20-25, San Diego, USA
 2. Kiyoshi Takeda, Makoto Matsumoto, Toll-like receptor-dependent innate immune responses in mycobacterial infection. US-Japan cooperative medical science program. 40th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, 2005.7.28-30, Seattle, USA
 3. Kiyoshi Takeda, Regulation of Toll-like receptor-mediated gene expression by nuclear I κ B proteins. The 6th EMBL Mouse Molecular Genetics Meeting, 2005.9.28-10.2, Heidelberg, Germany
 4. 竹田潔, Toll-like receptors and pathogen recognition (Symposium, invited) 第78回日本細菌学会総会、2005.4.4-6、東京
 5. 竹田潔, Toll-like receptor と結核感染 (シンポジウム) 第80回日本結核病学会、2005.5.12-13、
- 埼玉
6. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構 (ワークショップ、招待講演) 第5回日本蛋白質科学会年会、2005.7.1、福岡
 7. 竹田潔, Toll-like receptor を介した自然免疫系の制御 (特別講演) 第45回日本リンパ網内系学会総会、2005.7.14-15、福岡
 8. 竹田潔, 自然免疫系と炎症性腸疾患 (シンポジウム、招待講演) 第42回日本消化器免疫学会総会、2005.8.4-5、東京
 9. Kiyoshi Takeda: Regulation of innate immune responses against intracellular pathogen infection (Symposium) 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
 10. 桑田啓貴、竹田潔、Regulation of Toll-like receptor dependent gene induction by nuclear I κ B protein I κ BNS. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
 11. 古賀律子、濱野真二郎、松本真琴、久枝一、審良静男、姫野國介、竹田潔、Involvement of Toll-like receptor-dependent activation of innate immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
 12. 松本真琴、桑田啓貴、山本雅裕、審良静男、吉開泰信、竹田潔、The role of Toll-like receptor signaling in mycobacterial infection. 第35回日本免疫学会学術集会、2005.12.13-15、横浜
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

ドラッグ・デリバリー材料の改良と開発

分担研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所
生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

ステロイド、タクロリムス、bis-phosphonate などの薬剤のドラッグデリバリー材料として、ポリ乳酸からなる生体吸収性の微粒子を作製した。ポリ乳酸をジクロロメタン(O)に溶解後、水溶性薬物を含む水溶液(W₁)と混合することにより、W₁/O エマルジョンを形成させた。さらに、得られた W₁/O エマルジョンをポリビニルアルコール水溶液(W₂)中に分散させることにより、(W₁/O)/W₂ エマルジョンを形成させた。ジクロロメタンを蒸発させることにより、薬物が均一に内部に包埋されたポリ乳酸からなる微粒子を作製することができた。得られた薬物包埋ポリ乳酸微粒子について、光学顕微鏡を用いた観察ならびに in vitro における薬物の徐放試験を行った。作製条件を変化させることにより、ポリ乳酸微粒子の粒子径は変化した。また、in vitro での薬物放出挙動を調べたところ、微粒子の粒子径によって薬物放出速度は変化した。異なる大きさの微粒子をマウスに経口投与したところ、直径 5 μm より小さい粒子が腸粘膜 M 細胞から取り込まれ、脾臓へデリバリーされていることがわかった。さらに、臨床応用を目的として、ラージスケールかつクリーンな環境でのポリ乳酸微粒子の調製法について検討した。

A. 研究目的

本研究の目的は、腸粘膜 M 細胞を標的とした、ステロイド、タクロリムス、bis-phosphonate などの薬剤の徐放化のためのドラッグデリバリーシステム(DDS)素材を研究開発することである。この DDS システムのポイントは、目的の部位に薬物を到達させた後、徐放化することである。このためには、薬物のキャリアである粒子のサイズあるいは分解性などをコントロールすることが不可欠である。本研究では、ポリ乳酸からなる生体吸収性の微粒子をデザイン、作製するとともに、臨床応用へ向けたポリ乳酸微粒子の調製方法について検討した。前者に対しては、ポリ乳酸微粒子の作製と微粒子のサイズ、ならびに内部に包埋(内包)した薬物の徐放性の

評価を行っている。まず、粒子作製時における条件を変化させ、その条件が粒子サイズに与える影響について調べた。次に、作製した薬物包埋ポリ乳酸微粒子からの薬物の放出挙動について検討した。一方、後者に対しては、ラージスケール、かつヒトへの投与に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製法の検討を行った。

本研究の成果によって、腸粘膜 M 細胞への選択的な薬物のデリバリーと徐放化による効果的な薬物治療が可能となり、腸疾患治療への新たな可能性を開くことが期待できる。

B. 研究方法

本研究では、生体吸収性高分子である、L-乳酸とグリコール酸との共重合

体(PLGA)(乳酸:グリコール酸=50:50 重量平均分子:10,000)、ならびにポリ-D,L-乳酸(PDLLA) (重量平均分子量:20,000)を用いた。薬物としては、水溶性ステロイド(デカドロン)を用いた。デカドロン包埋 PLGA 微粒子ならびに PDLLA 微粒子は W/O/W ダブルエマルジョンを用いた液中乾燥法により作製した。すなわち、PLGA および PDLLA (100 mg)をジクロロメタン 2 ml に溶解させ、デカドロン水溶液 30 μ l を加えて、超音波照射を 15 秒間行った。得られた W/O エマルジョンを異なる重合度をもつポリビニルアルコール (PVA) 水溶液 (重合度 250-1800、1 wt%、4 ml)に加え、ホモジナイズ処理 (8200 rpm、10 秒)後、200 ml の PVA 水溶液中に分散させることにより W/O/W エマルジョンを形成させた。得られた W/O/W エマルジョンを 2 日間、室温で維持することで溶媒を蒸散させる、液中乾燥法により、デカドロン包埋ポリ乳酸微粒子を作製した。得られた微粒子は蒸留水で洗浄後、凍結乾燥した。本研究では、界面活性剤として用いた PVA の重合度(ユニチカ(株)から供与 ケン化度 = 78~88%)および PLGA のジクロロメタン溶液の濃度を変化させた。得られた微粒子サイズ分布を光学顕微鏡で調べた。また、微粒子を生理食塩水中にて振とうし、上清中に放出されたデカドロンを高速液体ク

ロマトグラフィー (HPLC) により定量することによって、微粒子からの薬物の徐放性を評価した。次に、同様の方法で、蛍光物質であるクマリンを含有した PDLLA 微粒子を作製した。これらの微粒子をマウスに経口投与した後の体内分布について調べた。

臨床応用を目指したラージスケールかつヒトへの投与に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製法の検討を行った。上述した粒子作製法の 5 倍容のスケールアップを行い、ホモジナイズ時間、ならびに超音波照射時間が微粒子の収率ならびに粒子系に与える影響について検討した。一方、クリーンな環境として、病院薬剤部に設置されている経口投与薬剤の調剤に使用されている調剤室を利用した。その室内で、これまでの実験室とは異なる環境で微粒子の作製が可能な体制を整えた。

C. 研究成果

PVA の重合度ならびに PLGA の溶液濃度が微粒子サイズに与える影響を調べたところ、用いる PVA の重合度が大きくなるとともに、得られた微粒子サイズは増加することがわかった。PVA 水溶液の表面張力を測定したところ、PVA の重合度の低下とともに表面張力が小さくなる傾向が認められた。すなわち、表面張力の低下とともに、より大きな表面積をもつ直径の小さな PLGA 溶

液滴が水中で安定に形成され、その結果、微粒子の粒子サイズが小さくなったと考えられる。一方、PLGA の濃度の低下とともに、得られた粒子サイズは小さくなった。これは、PLGA 溶液の粘度の低下が原因である。デカドロン包埋 PLGA 微粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。表面が平滑な真球の粒子が作製できていることがわかった。得られた異なる粒子径(平均粒子サイズ 4、10、および 15 μm)の微粒子からのデカドロン *in vitro* における徐放性を調べたところ、粒子径が小さいほど薬物の放出速度が速いことがわかった。

次に、平均粒子サイズが 3、5、および 10 μm のクマリン包埋 PDLLA 微粒子のマウスへの経口投与 1 週間後、脾臓の凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、粒子サイズ 3 μm の微粒子のみが脾臓で確認され、より大きなサイズをもつ粒子は異なった体内分布を示した。

一方、ラージスケールでポリ乳酸微粒子を作製した場合、微粒子作製過程で形成される W/O および W/O/W エマルジョンの液滴のサイズを小さくする必要がある。そこで、それぞれのエマルジョンを形成させる条件、すなわち、超音波照射時間、およびホモジナイザー処理の時間を変化させて、得られた微粒子の粒子径を評価したところ、超音波照射時間 240 秒、ホモジナイザー処理

時間 90 秒の場合、スモールスケールと同様に、平均粒子径が 5 μm 程度の粒子を得ることができた。また、このようにして条件検討したラージスケールでの微粒子の作製を病院薬剤部内の経口投与薬剤の調剤室で行うことを計画し、調剤室内で薬物包埋ポリ乳酸微粒子の作製が可能な体制を整えることができた。調剤室の空気清浄度はクラス 100,000 であり、調剤室と外界との間に、前室ならびにエアロック室を設けて、比較的クリーンな環境を整えることができた。

D. 考察

腸粘膜 M 細胞は、細菌などを消化することなく取り込み、腸粘膜リンパ装置の免疫担当細胞に効率よく送り込む細胞である。この腸粘膜リンパ装置は、免疫反応の中心であり、潰瘍性大腸炎、クローン病などの炎症性腸疾患 (IBD) や移植医療における問題の一つである Graft versus Host Disease (GVHD) などの病態において、中心的な役割を果たしていることが知られている。これまでに、われわれは、腸粘膜 M 細胞が特定の大きさの粒子を特異的に取り込むことに着目し、生体吸収性高分子であるポリ乳酸からなる微粒子を利用して、経口および経腸的に投与した微粒子が M 細胞から取り込まれた後、腸粘膜リンパ装置に特異的に分布すること、また、

投与した薬剤が血中には流出しないことを示してきた。これらの結果を踏まえ、より効果的に腸粘膜 M 細胞をターゲティング可能な DDS システムの構築とその臨床応用を目指したラージスケールでの生産方法を確立することが本研究の目的である。そこで、まず、生体吸収性高分子の分子量や PVA の重合度などの物理化学的性質を変化させることにより、粒子径の異なる微粒子を作製し、微粒子の粒子径が薬物の徐放性や腸粘膜 M 細胞に対するターゲティング能などに与える影響について検討した。その結果、粒子径が大きくなるにつれて、より持続的に薬物を放出することが可能である反面、腸粘膜 M 細胞に対するターゲティング能が低下することがわかった。本研究では、投与した薬物が腸粘膜 M 細胞に取り込まれることが Key であることから、薬物徐放性を維持しながら、腸粘膜 M 細胞に取り込まれる、粒子径が 5 μm 以下の微粒子を DDS 素材として選択した。

次に、粒子径が小さい薬物ホウ舞微粒子を大量生産するために、ラージスケールでの微粒子の調製を行った。微粒子の粒子径を規定する工程は、W/O ならびに W/O/W エマルジョンを形成させる条件、ならびに PVA 水溶液の表面張力である。これらの観点から、エマルジョン形成の条件ならびに用いる PVA の分子量を変化させることにより、ラー

ジスケールでも粒子径が 5 μm 以下の微粒子を 70~80% の高収率で得ることができた。また、同時に、臨床応用に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製を行う設備を整えることができた。今後は、より高収率で目的の粒子径をもつ微粒子を得ることができるよう、作製法の最適化を進めていく。また、異なる包埋量の微粒子を作製し、薬物の徐放性や血中への流出量などを検討することにより、より効率よく薬物治療が可能な DDS 素材を開発していく予定である。

E. 結論

作製条件を変化させることにより、異なる粒子径ならびに薬物徐放性をもつ生体吸収性微粒子を作製することができた。薬物徐放性ならびに腸粘膜 M 細胞へのターゲティング能は、微粒子の粒子径に依存し、ターゲティング能という観点から、5 μm 以下の微粒子が腸粘膜 M 細胞へのドラッグデリバリーに有効であることがわかった。また、臨床応用を目指したラージスケールでのポリ乳酸微粒子の作製条件について検討した。本研究を通じて確立した方法に基づいて、臨床応用に耐えうるクリーンな環境で微粒子を作製できるように施設の準備を整えた。今後は、より詳細な検討を進めることによって、企業との連携に基づいた微粒子作製技術の改良とその治療学的な評価を行っていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuura M, Okazaki K, Nakase H, Tamaki H, Tabata Y, Chiba T: Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. *Gastroenterology* 128:975-986:2005.
2. Eshita Y, Uemoto S, Tabata Y, Sakamoto S, Egawa H, Hashida T, Inui K, Tanaka K: Drug delivery system using microspheres that contain tacrolimus in porcine small bowel transplantation. *Transpl. Int.* 17:841-847:2005.

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

抗原特異的な腸炎モデルの作成及び 腸炎実効細胞、抑制細胞の細胞調節機序の研究

分担研究者 若月芳雄 京都大学医学研究科老年内科学 講師

研究要旨： 腸管粘膜M細胞は管腔内微生物性抗原を選択的に取り込むと、腸管粘膜附属リンパ組織に移動して抗原特異的 CD4T 細胞を活性化する。同部で起こる免疫反応の炎症性腸疾患形成における役割、および細胞性免疫調節機序を、抗原特異的に起こる腸炎モデルを作成して解析した。粘膜傷害性 CD4T 細胞は腸管粘膜附属リンパ節でクローンの増大が起こるが、その機能により局在が異なることと、同リンパ組織において調節性 CD4T細胞による炎症制御が行われる。

A. 研究目的

クローン病や潰瘍性大腸炎（以下炎症性腸疾患）は原因が不明のため疾患特異的な治療法の開発が、これまで困難であった。患者の腸管組織・末梢血あるいは、実験腸炎モデルを用いたこれまでの報告から、特定の抗原特異性を有するTリンパ球の増加が認められること、またそのTリンパ球機能を抑制するような免疫学的な処置により、実験腸炎を阻止できることから、腸管腔内の主に微生物性抗原に対する宿主の細胞性免疫調節異常が病原機序に大きく関わることを示唆されてきた。しかしながら、抗原特異的な免疫反応を解析できる腸炎モデルが存在しないため、病原機序、治癒機序における、宿主の細胞性免疫の果たす役割は充分解明されていない。我々は、免疫遺伝学的方法を用いて、腸炎実効細胞を炎症局所で同定できる腸炎モデルを作成してその病態形成に果たす役割、および免疫調節性細胞の腸炎抑制に果たす役割を、

主にM細胞が存在する腸管不随リンパ組織との関係を主に解析した。

B. 研究方法

腸炎モデルとして卵白アルブミン(OVA)特異的なT細胞抗原受容体を遺伝子導入により強制発現させたマウスあるいは、その細胞を移入した SCID マウスを用いた。これらのマウスに OVA 蛋白を発現する組換え大腸菌を経口より投与することにより腸炎を惹起した。上記マウスに IL-4, あるいは IFN- γ 遺伝子の欠失を導入する、あるいは OVA 特異的な Th1, Th2細胞を SCID マウスに移入することにより腸炎実効細胞の機能とその局在、炎症病理の差違を検討した。また、上記腸炎モデルに、マウス脾臓より CD4+CD25+型の免疫調節細胞を精製して移入し、腸炎阻止効果およびその機序を検討した。

C. 研究結果

上記腸炎モデルにおいては、組換え大腸菌感染約10日から2週間後に体重の変化

を伴う腸炎が認められた。リンパ球の組織浸潤は大腸の粘膜に付随したリンパ濾胞及び、T細胞領域から始まり、経時的に浸潤細胞数は増大し、腺管構造の破壊、潰瘍・陰窩膿瘍の形成を伴う腸炎を認めた。SCID の系では、Th1, Th2 いずれの細胞の移入によっても腸炎は惹起され、Th1 型の腸炎実効細胞が粘膜固有層に慢性に存在するのに対してTh2型の腸炎実効細胞は、比較的濾胞に多数局在した。免疫調節細胞の移入により、腸炎惹起細胞の浸潤と局所の炎症性サイトカイン産生は著明に抑制された。移入した免疫調節細胞は大腸のリンパ濾胞組織に局在する傾向が認められた。

D. 考察

ヒトの潰瘍性大腸炎類似の組織変化を伴う腸炎モデルを作成した。微生物性抗原により、CD4T細胞が濾胞組織で活性化・増殖した結果、組織障害が起こること、その機能によりその局在が異なる。またCD4+CD25+T細胞が腸炎を抑制し得ること、その機序としてやはりリンパ濾胞組織

が重要な役割を果たすことが示された。

E. 結論

腸管付随リンパ組織の上皮層にはM細胞が存在することから、M細胞を標的にして免疫反応を調節する薬剤を投与することは、本研究からその理論的妥当性が証明された。

F. 研究発表

Tomohiro Watanabe, Masashi Yamori, Toru Kita, Tsutomu Chiba, and Yoshio Wakatsuki

CD4+CD25+ T cells regulate colonic localization of CD4 T cells reactive to a microbial antigen. *Inflammatory Bowel Diseases* 2005, (6)541-550

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他

別紙4 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻(号)	ページ	出版年
Fukuda A, Nakase H, Seno H, Nabeshima M, Sawada M, <u>Chiba T</u> .	Refractory enterovesical and duodenocolic fistulas in Crohns disease successfully managed with tacrolimus.	J Gastroenterol	40	433-435	2005
Matsuura M, Okazaki K, Nishio A, Nakase H, Tamaki H, Uchida K, Nishi T, Asada M, Kawasaki K, Fukui T, Yoshizawa H, Ohashi S, Inoue S, Kawanami C, Hiai H, <u>Tabata Y</u> , <u>Chiba T</u>	Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis.	Gastroenterology	128 (4)	975-986	2005
Fujii S, Tominaga K, Kitajima K, Takeda J, Kusaka T, Fujita T, Ichikawa K, Tomita S, Ohkura Y, Ono Y, Imura J, <u>Chiba T</u> , Fujimori T	Methylation of the estrogen receptor gene in non-neoplastic epithelium as a marker of colorectal neoplasia risk in long-standing and extensive ulcerative colitis.	Gut	54	1287-1292	2005
Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, Sawabu T, Hisatsune H, Seno H, Fujimori T, <u>Chiba T</u>	Possible role of REG I α protein in ulcerative colitis and colitic cancer.	Gut	54	1437-1444	2005
Watanabe T, Yamori M, Kita T, <u>Chiba T</u> , <u>Wakatsuki Y</u>	CD4+CD25+T cells regulate colonic localization of CD4 T cells reactive to a microbial antigen.	Inflamm Bowel Dis	11	541-550	2005

Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, <u>Chiba T</u> , Okazaki K	Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn' s disease.	Inflamm Bowel Dis	12	62-69	2006
Uza N, Nakase H, Nishimura K, Yoshida S, Kawabata K, <u>Chiba T</u>	Solitary rectal ulcer syndrome associated with ulcerative colitis.	Gastrointes t Endosc	63	355-356	2006
Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, <u>Chiba T</u> , Okazaki K	Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of <i>Mycobacterium avium</i> subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn' s disease.	Inflamm Bowel Dis	12	62-69	2006
Uza N, Nakase H, Nishimura K, Yoshida S, Kawabata K, <u>Chiba T</u>	Solitary rectal ulcer syndrome associated with ulcerative colitis.	Gastrointes t Endosc	63	355-356	2006
Kweon MN, Yamamoto M, Rennert PD, Park EJ, Lee AY, Chang SY, Hiroi T, Nanno M. and <u>Kiyono H</u> .	Prenatal blockage of lymphotoxin beta receptor and TNF receptor p55 signaling cascade resulted in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine.	J. Immunol.	174	4365-4372	2005
Kobayashi R, Kohda T, Kataoka K, Ihara H, Kozaki S, Pascual DW, Staats HF, <u>Kiyono H</u> , McGhee JR. and Fujihashi K.	A novel neurotoxin vaccine prevents mucosal botulism.	J. Immunol.	174	2190-2195	2005
Kai Y, Takahashi I, Ishikawa H, Hiroi T, Mizushima T, Matsuda C, Kishi D, Hamada H, Tamagawa H, Ito T, Yoshizaki K, Kishimoto T, Matsuda H. and <u>Kiyono H</u> .	Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain mediated by IL-6 - producing CD4+ T cells.	Gastroenter ology	128	922-934	2005

Nonaka S, Naito T, Chen H, Yamamoto M, Moro K, <u>Kiyono H</u> , Hamada H. and Ishikawa H.	Intestinal gamma delta T cells develop in mice lacking thmus, all lymph nodes, Peyer' s patches, and isolated lymphoid follicles.	J. Immunol.	174	1906-1912	2005
Ohmura M, Yamamoto M, Tomiyama-Miyaji C, Yuki Y, Takeda Y. and <u>Kiyono H</u> .	Nontoxic Shiga toxin derivatives from Escherichia coli possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation.	Infect. Immun.	73	4088-4097	2005
Ueta M, Hamuro J, <u>Kiyono H</u> . and Kinoshita S.	Triggering of TLR3 by polyI:C in human corneal epithelial cells to induces inflammatory cytokines.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	331	285-294	2005
Hino A, Fukuyama S, Kataoka K, Kweon MN, Fujihashi K. and <u>Kiyono H</u> .	Nasal IL-12p70 DNA prevents and treats intestinal allergic diarrhea.	J. Immunol.	174	7423-7432	2005
Takagi H, Hiroi, T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamura K, Ishimitsu R, Kawauchi H, <u>Kiyono H</u> . and Takaiwa F.	A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th-2 mediated IgE responses.	Proc. Nat. Acad. Sci. USA.	29	17525-17530	2005
Kunisawa J, Fukuyama S. and <u>Kiyono H</u> .	Mucosa-associated lymphoid tissues in the aerodigestive tract: their shared and divergent traits and their importance to the orchestration of the mucosal immune system.	Curr. Mol. Med.	5	557-572	2005
Kunisawa J. and <u>Kiyono H</u> .	A marvel of mucosal T cells and secretory antibodies for the creation first lines of defense.	Cell Mol. Life Sci.	62	1308-1321	2005

Sato, S., Sanjo, H., <u>Takeda, K.</u> , Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O., and Akira, S.	Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses.	Nat. Immunol	6	1087-1095	2005
Hirotsani, T., Lee, P. Y., Kuwata, H., Yamamoto, M., Matsumoto, M., Kawase, I., Akira, S., and <u>Takeda, K.</u>	The nuclear I κ B protein I κ BNS selectively inhibits lipopolysaccharide-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria.	J. Immunol	174	3650-3657	2005
Kuwata, K., Matsumoto, M., Atarashi, K., Morishita, H., Hirotsani, T., Koga, R., and <u>Takeda, K.</u>	I κ BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor-dependent genes and limits inflammation.	Immunity	24	41-51	2006
Eshita Y, Uemoto S, <u>Tabata Y</u> , Sakamoto S, Egawa H, Hashida T, Inui K, Tanaka K	Drug delivery system using microspheres that contain tacrolimus in porcine small bowel transplantation.	Transpl. Int.	17	841-847	2005