

200712006B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発

平成17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 千葉 勉

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総合研究報告

腸粘膜M細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発	-----	1
千葉 勉		

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	39
--------------------	-------	----

腸粘膜 M 細胞を標的としたドラッグデリバリー・システムの開発

主任研究者 千葉 勉 京都大学医学研究科消化器内科学講座・教授

研究要旨：GVHD や炎症性腸疾患に対するより効果的でかつ副作用の少ない薬剤を開発する目的で、腸粘膜 M 細胞を標的としたドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発をおこない、ヒトへの投与試験をおこなった。その結果以下の成績が得られた。(1) デキサメサゾン含有ポリ乳酸マイクロスフェア (PL-MS) の作製条件を変化させることにより、より優れた薬物徐放性及び腸粘膜 M 細胞へのターゲティング能を検討し、3 μ 以上5 μ m以下のPL-MSが最も効率的に腸粘膜に吸収されることを確認した。(2) これをもとに京都大学医学部附属病院薬剤部において、GMPに則して、臨床応用を目指したラージスケールでのPL-MS作製条件を検討し、臨床応用に耐えうるクリーンな環境におけるラージスケールでのPL-MS作製体制を構築した。(3) PL-MSがターゲットとするM細胞について、基礎的検討をおこない、絨毛M細胞とパイエル板M細胞の遺伝子プロファイルが異なること、また腸管の部位によるM細胞の分布が異なることが明らかとなった。またパイエル板M細胞に特異的に発現する遺伝子としてPGRP-S, Sgna-1, annexin Vを認め、このうち腸内細菌の菌体成分を認識すると考えられる分子PGRP-Sがパイエル板B細胞におけるIgA産生を抑制的に制御して、抗原非特異的な抗体産生を抑制している可能性が示唆された。(4) 腸管免疫に重要な役割をはたすTLRを介したNF- κ B依存性の遺伝子発現には早期誘導型と遅期誘導型遺伝子が存在し、遅期誘導型遺伝子の発現をI κ B分子I κ BNSが抑制することを見いだした。また早期誘導型遺伝子のプロモータはクロマチン構造が常に開いており転写因子が迅速にアクセスしやすい状況になっているのに対して、遅期誘導型遺伝子のプロモータはクロマチンが閉じており、TLR刺激により構造返還をうけて開き、その後転写因子がアクセスできるようになるために、遺伝子発現の時間が異なる事が明らかとなった。(5) 炎症性腸疾患と深く関るTh17細胞の発育、維持には常在菌の存在が必須であり、またその効果はTLR非依存性であることから、Th17分化における新たな細菌由来物質の存在が示唆された。今後これらの制御も治療のターゲットとなりうると考えられた。(6) ステロイド含有PL-MSの効果を高めるために、IL10発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンの同時投与、およびステロイドにbifidobacterium lognamを同時に包埋して投与する方法を考案し、動物実験でDSS, TNBS腸炎に対してその効果を検討した。その結果ステロイドPL-MS単独の場合と比較してその腸炎抑制効果はより強力であった。(7) 改良したデキサメサゾン包埋PL-MSを用いて16例の中等症以上の潰瘍性大腸炎患者に対して治療を行ったところ、4週間で全員改善し、CAIスコアは平均11.6点から6.7へと改善した。以上からデキサメサゾンPL-MSは、潰瘍性大腸炎患者に対する、より副作用が少なく有効な治療法と考えられた。

【分担研究者】

清野 宏
東京大学医科学研究所 教授
竹田 潔
大阪大学医学系研究科 教授
田畑泰彦
京都大学再生医科学研究所 教授
若月芳雄
京都大学医学研究科 講師

A. 研究目的

炎症性腸疾患や GVHD (Graft vs Host Disease)は、それぞれ自己の免疫細胞の異常反応や、移植された際に導入された血球細胞による異常な免疫反応により生じる炎症性の腸病変

であるが、それぞれ食生活の欧米化を含めた環境の変化、および移植医療の普及、によってともに増加傾向にある。これらの疾患の治療においては現在、ステロイドをはじめとした免疫抑制薬投与がその中心をなしている。しかしながらこれら免疫抑制薬は、全身に投与した場合その免疫抑制作用により感染症などの重篤な副作用を来しやすい。またこのために全身投与では薬剤を十分量投与できず、その結果期待される効果がえられない場合が多い。こうした問題を解決するためには、炎症の存在する腸粘膜へ特異的に薬物を集積させるドラッグデリバリーシステム (DDS) を確立することが必要となる。

腸粘膜 M 細胞は腸内細菌などの抗原を消化することなくそのまま腸粘膜に取り込ませて、パイエル板などのリンパ装置に存在する抗原提示細胞に抗原を提示させる細胞である。そこで私達は、この M 細胞が一定の大きさの粒子を特異的に取り込むことに着目して、ポリ乳酸マイクロスフェア (PL-MS) による M 細胞を標的とした DDS を確立した。今回この PL-MS に薬剤を包埋することによって、腸粘膜のリンパ装置に薬物を特異的に集積させる DDS の開発を試み、実際にヒトへの臨床試験をおこなった。

B. 研究方法

- (1) PL-MS 剤形の改良：PL-MS 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。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。ポリ-D,L-乳酸(PDLLA) (重量平均分子量：20,000) に水溶性ステロイド(デカドロン)を加え、W/O/W ダブルエマルジョンを作成した。得られた W/O/W エマルジョンを2日間室温で維持し、液中乾燥法によりステロイド包埋 PL-MS を作製した。本研究では、界面活性剤として用いた PVA の重合度および 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ステロイドを HPLC で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、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 (田畑)。
- (2) 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できるように、微粒子作製器具および必要装置を整えるとともに、微粒子作製操作上、必要となる事項について詳しく検討した (田畑)。
- (3) M 細胞の基礎的検討 : M 細胞を特異的に染色する UEA1 レクチンを用いて、腸粘膜 M 細胞をソーティングして、腸粘膜細胞、パイエル板 M 細胞、腸粘膜 M 細胞とで DNA アレイを行い、M 細胞特異的な分子の同定を試みた。その結果 M 細胞特異的な分子として、細菌表層成分との結合分子と考えられる Peptidoglycan Recognition

Protein S (PGRP-S)を得た。この PGRP-S KO マウスを作成し、M 細胞反応レクチンである UEA-1 を用いて in situ ハイブリダイゼーション法および免疫組織学染色法により発現を確認した。また本マウスに *Micrococcus luteus* を経口感染させた。さらに PGRP-S の免疫生物学的機能をフローサイトメトリー、ELISA 法、ウエスタンブロット法を用いた細胞内シグナルの活性化の測定、共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫組織染色切片の観察により解析した (清野)。

- (4) 腸粘膜免疫の基礎的検討 : 腸管特異的に発現している Toll-like receptor (TLR) の活性化制御機構について検討した。とくに近年新たなヘルパー T 細胞のサブセットとして同定された Th17 細胞は、炎症性腸疾患の発症にも深く関与していることが明らかになっている。Th17 細胞は正常では種々のリンパ組織にはほとんど観察されないが、腸管の粘膜固有層に多数存在している。そこで、腸管粘膜固有層に Th17 細胞を誘導しうる樹状細胞がないかを検討した。Toll-like receptor (TLR) を介したシグナ

ルの消失する MyD88/TRIF 二重欠損マウスや、腸内常在菌のいない germ free マウスを用いて、腸管粘膜固有層での IL-17 産生細胞をフローサイトメトリーで解析した。大腸の粘膜固有層から、CD11c 陽性樹状細胞を単離し、脾臓由来のナイーブ CD4 陽性細胞と共培養した後 CD4 T 細胞を回収し、PMA+ionophore 刺激による IL-17 発現を real-time Q-PCR 法で解析した。さらに、CD11c 陽性細胞の中で、CD70high, CD70low のサブセットを FACS ソーティングにより精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 陽性細胞と共培養し、CD4 T 細胞の PMA+ionophore 刺激による IL-17 発現を解析した。CD70high, CD70low 樹状細胞での IL-6 や TGF-beta 活性化に関わるインテグリン alphaV, beta8 の発現も解析した (竹田)。

- (5) ステロイド包埋 PL-MS の効果を増強するための手段として IL10 の発現プラスミドベクターをカチオン化ゲラチンと結合させて、これをステロイド包埋 PL-MS とともに投与して、その炎症性腸疾患に対する効果を動物実験で検討した。またステロイド包埋 PL-MS にプロバイオ

テイクスである *Bifidobacterium lognam* を同時に包埋し、本 PL-MS の炎症性腸疾患に対する効果をステロイド単独 PL-MS と比較した (千葉、若月)。

- (6) 5ASA 製剤および経口ステロイド剤にて緩解が得られていない中等症以上の潰瘍性大腸炎患者 (CAI スコア 4 点以上) を対象にデキサメサゾン包埋 PL-MS ($10 \mu\text{g/ml PL-MS/kg bw}$) を一日一回注腸投与して、その効果を検討した (千葉)。

C. 研究結果

- (1) 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した。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 溶液滴が安定に形成され、その結果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。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の *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。また、デカドロンの徐放パターンに、高分子の分子量が影響を与えていることがわかった。分子量の増加とともに、薬の徐放は抑制され、より長い期間の徐放化が可能となった。

次に、平均粒子サイズが3、5、および10 μm のクマリン包埋PLGAおよび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。腸管からの吸収効率は粒子径3.5 μm あたりが最もよかったが、粒子径が5 μm 以上になると腸粘膜局所にとどまり、その部位で薬を徐放化することがわかった。

- (2) 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（超音波照射時間、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。また、微粒子の回収率を上げるための条件設定を行い、70-80%の収率を達成することが可能となった。

- (3) (a) M細胞を特異的に染色する UEA-1 レクチンを用いた組織学的観察ならびに FACS 解析の結果、正常 BALB/c マウスの十二指腸・空腸上皮層において、パリエル板M細胞は約5-7%の比率

で認められた。一方絨毛M細胞は回腸上皮層に高頻度に存在するものの(約60%)、十二指腸・空腸上皮層においてはほとんど認められなかった(約1%)。

(b) パイエル板M細胞細胞、絨毛M細胞上皮細胞についてマウスの十二指腸・空腸から、調製した。これらと小腸上皮細胞分画とで包括的発現遺伝子プロファイリングを行った結果、パイエル板M細胞細胞、絨毛M細胞、上皮細胞において、それぞれ17922、14468、15636個の発現プローブが同定された。パイエル板M細胞特異的遺伝子として既に報告されているPGRP-S、Sgne-1、annexin Vの発現を調べた結果、これら全ての遺伝子の発現が認められたのはパイエル板M細胞画分のみであった。次にIn situ ハイブリダイゼーションを行った結果、PGRP-S特異的mRNAの発現を確認した。次にPGRP-Sに対するポリクローナル抗体を作製し、タンパク質レベルの発現を調べたところ、パイエル板M細胞における発現を認めるが、絨毛M細胞には発現していないことが明らかとなった。

(c) PGRP-S KO マウスを用いた

解析により、PGRP-SがM細胞の発生・分化ならびに抗原取り込み能に影響を与えることはなかった。しかしながら、グラム陽性菌である *Micrococcus luteus* で経口免疫すると、野生型マウスと比べ、パイエル板B細胞の活性化がPGRP-S KOマウスの方で強く、IgAも多く産生されることが分かった。また野生型のパイエル板B細胞を単離し、PGF刺激下にIgA産生を誘導すると、精製リコンビナントPGRP-Sを加えたものは、IgA産生が抑制された。またその際、PGRP-SがTLR2シグナルの下流でNF- κ Bの活性化を抑制していることが明らかになった。

- (4) MyD88欠損マクロファージでは、TLR刺激によるNF- κ B依存性の遺伝子の発現は障害されている。しかし、MyD88欠損マクロファージをTLR4刺激するとTRIF依存性の一見無意味なシグナルが活性化される。そこで、MyD88欠損マクロファージをTLR4リガンドで刺激し、早期誘導型と遅期誘導型の各遺伝子のmRNAの発現誘導をリアルタイムPCR法で解析した。その結果、遅期誘導型の遺伝子はMyD88欠損マクロファージでは全く誘導されないが、

早期誘導型の遺伝子はかなり減弱しているもののかすかに誘導された。このかすかな早期誘導型遺伝子の発現は、MyD88/TRIF 二重欠損マクロファージでは全く認められなかった。このように、早期誘導型遺伝子は、極めて発現誘導されやすく、一見無意味なシグナルが入ることによって、かすかに誘導されることが明らかになった。

次に、早期誘導型、遅期誘導型遺伝子としてそれぞれ MIP2, Lcn2 遺伝子を代表として取り上げ、各遺伝子プロモーターへの、NF-kBp65 サブユニット、RNA polymerase II, TBP のリクルートをクロマチン免疫沈降法により解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターへのこれら転写制御因子群のリクルートは刺激後 180 分より認められ、MyD88 欠損マクロファージでは全く認められない。一方、早期誘導型遺伝子のプロモーターへは、刺激後 15 分ときわめて早い時間から認められ、さらに MyD88 欠損マクロファージでも有意に認められた。この結果から、早期誘導型遺伝子のプロモーターは、転写制御因子がきわめてアクセスし易い状態であることが明らかに

なった。

そこで、次に各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。遅期誘導型遺伝子プロモーターではヒストン H3 のメチル化は認められず、TLR 刺激 180 分から観察された。一方、早期誘導型遺伝子プロモーターでは、メチル化が刺激以前から常に見られた。この結果から、早期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が常に開いた状況にあり、その結果転写制御因子がアクセスし易く、遺伝子発現が早期に誘導されることが明らかになった。一方、遅期誘導型遺伝子プロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激によって構造変換を受け、転写制御因子がアクセスされやすくなること、そしてこのことが、遺伝子発現が遅れるメカニズムであることが明らかになった。

次に、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造変換に関与する分子について解析を行った。これまでに IkbNS と同じ核に発現する Ikb 分子である Ikbzeta が遅期誘導型遺伝子の発現に関与していることを示したきた。実際、Ikbzeta 欠損マク

マクロファージでは、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現が障害されている。IkBzeta は TLR 刺激により早期に誘導される遺伝子の一つである。そこでマクロファージに IkBzeta を常時発現させ、TLR 刺激による遅期誘導型遺伝子の発現を解析した。IkBzeta を発現させたマクロファージでは、遅期誘導型遺伝子の発現誘導が早く観察されるようになった。また、遅期誘導型遺伝子プロモーターへの転写制御因子のリクルート、メチル化の誘導も早く観察されるようになった。これらの結果から、IkBzeta は、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造を変換させることにより遺伝子発現の誘導に関与していることが明らかになった。

IL-17 陽性 CD4 細胞は、脾臓、腸管リンパ節、パイエル板などのリンパ組織では 1%程度しか認められないが、小腸、大腸粘膜固有層では、15-30%もの CD4 細胞が IL-17 を産生していた。腸管の粘膜固有層の CD4 陽性細胞を精製し、Th17 細胞のマーカーである IL-17A, IL-17F, IL-22, Ror γ t の mRNA の発現を real time Q-PCR で解析しても、これらの発

現は腸管リンパ節由来の細胞よりも極めて高かった。TLR シグナルの消失する MyD88/TRIF doubleKO マウスでも、腸管の粘膜固有層の IL-17 産生細胞は正常マウスと同様に存在した。一方、腸管細菌叢のない germ free マウスでは、IL-17 産生 CD4 細胞は激減していた。以上より Th17 細胞は腸内常在菌依存性、TLR 非依存性に誘導されることが示唆された。

次に、腸管粘膜固有層に Th17 分化を誘導する樹状細胞が存在している可能性を解析した。大腸粘膜固有層より、CD11c 陽性細胞を精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 T 細胞と 5 日間共培養し再刺激による IL-17 の発現を解析すると、脾臓の CD11c 陽性細胞と共培養した CD4 細胞では IL-17 の発現は誘導されないが、大腸粘膜固有層の CD11c 陽性細胞と共培養した細胞は IL-17 を強く発現していることが明らかになった。この結果から、腸管粘膜固有層の樹状細胞には、Th17 細胞の分化を誘導する活性があることが示唆された。次に腸管粘膜固有層の CD11c 陽性細胞を種々の細胞表面マーカーで染色した。その結果、腸管粘膜

固有層の CD11c 陽性細胞は、脾臓の CD11c 陽性細胞と異なり、CD70low, CD70high のサブセットが存在していることが明らかになった。そこで、CD70low, CD70high 樹状細胞を大腸粘膜固有層より精製し、脾臓由来のナイーブ CD4 T 細胞と 5 日間共培養し、再刺激による IL-17 の発現を解析した。その結果、CD70low 細胞と共培養した T 細胞では、IL-17 の発現は誘導されないが、CD70high 樹状細胞と共培養した T 細胞では IL-17 の発現が強く誘導された、また CD70high 樹状細胞は、CD70low 樹状細胞に比べて、IL-6 や TGF-beta 活性化に関わるインテグリン alphaV, beta8 の発現が亢進していることが明らかになった。IL-6, alphaV, beta8 の発現は、germ free マウス由来の CD70high 細胞では、SPF マウスに比べて低下していた。これらの結果から、CD70high 樹状細胞は腸内常在菌により IL-6, alphaV, beta8 を発現し、Th17 細胞分化を誘導することが示唆された。

- (5) DSS 腸炎、および TNBS 腸炎マウスに対して、IL10 発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラ

チンをステロイド PL-MS と同時に投与させた場合、ステロイド PL-MS 単独投与に比較してその腸炎抑制効果は著明に増強し、同時に腸粘膜における種々の炎症性サイトカインの発現、炎症細胞浸潤は減少した。また同じ DSS 腸炎、TNBS 腸炎マウスに対して、ステロイド包埋 PL-MS に bifidobacterium lognam を同時に包埋して投与すると、その腸炎の抑制効果はステロイド単独の場合と比較してより強力であった。その際腸粘膜のサイトカインプロファイルを検討すると、IFN γ および IL17 産生の低下、逆に IL4 産生の増加が観察された。

- (6) 現在までに十分なインフォームドコンセントを得た後、ヒトへのステロイド包埋 PL-MS 投与を 16 例の潰瘍性大腸炎患者に対しておこなった。平均年齢は 33 歳 (男 9、女 7 例) で、全員全結腸型で、CAI スコアは平均 11.6 点であった。その結果 4 週間投与にて炎症は全例で改善傾向を示し、CAI スコアは 6.7 へと改善した。またステロイド投与量も 18.5mg から 9.2mg まで減量できた。さらに投与期間中、投与後も特にステロイド投与によると

考えられる副作用は認めなかった。

D. 考察

今回私たちはまず PL-MS の改良を試みた。そして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、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 3μ 以上 $5\mu\text{m}$ 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包埋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。加えて、粒子径と収率の再現性の確認を行った。また、臨床応用に耐えうるクリーンな環境での微粒子作製設備内においても、同様の粒子作製が可能であることを確認した。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る予定である。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。

このように改良したデキサメサゾン包埋 PL-MS を用いて 16 例の中等症以上の潰瘍性大腸炎患者に対して治療を行ったところ、4 週間で全員改善を示し、CAI スコアは平均 11.6 点から 6.7 へと改善した。またステロイド投与量も 18.5mg から 9.2mg まで減量できた。さらに投与期間中、投与後も特にステロイド投与によると考えられる副作用は認めなかった。以上からデキサメサゾン PL-MS は、潰瘍性大腸炎患者に対する、より副作用が少なく有効な治療法と考えられた。今後本薬剤を用いた大規模臨床試験、あるいは医師主導臨床治験を計画したいと考えている。

私たちはさらに、本ステロイド含有 PL-MS の効果を高めるために、IL10

発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンの同時投与、およびステロイド包埋 PL-MS に *bifidobacterium lognam* を同時に包埋して投与する方法を考案し、動物実験で DSS, TNBS 腸炎に対してその効果を検討したが、これらによる腸炎の抑制効果はステロイド PL-MS 単独の場合と比較してより強力であった。このことから今後ステロイド PL-MS にこれらを併用する方法もヒトで検討をおこなうことを計画している。

今回私たちは PL-MS がターゲットとする M 細胞について、さらなる基礎的検討をおこなった。まず FACS 解析の結果、十二指腸・空腸由来分散上皮細胞群においてパイエル板 M 細胞は約 5 ~ 7 % 存在することが示された。しかし絨毛 M 細胞がほとんど存在しないことが示唆された (<1%)。一方、回腸には高彩度で絨毛 M 細胞が存在していた。

このように調製された各細胞画分を検証するために DNA マイクロアレイ法による包括的発現遺伝子解析を行った。その結果、パイエル板 M 細胞特異的遺伝子として知られている PGRP-S、Sgne-1、annexin V の発現はパイエル板 M 細胞画分のみであり、本研究で確立された単離法の信頼性を示していた。これらの M 細胞特異的分子のうち PGRP-S はパイエル板

M 細胞に発現し、絨毛 M 細胞には発現していないことから、両者を区別して単離する新しい指標となることが示唆された。一方 PGRP-S KO マウスの解析から、PGRP-S がパイエル板 B 細胞における IgA 産生を抑制的に制御することにより、樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や T 細胞を介さない抗原非特異的な抗体産生を抑制している可能性が示唆された。分子生物学的に PGRP-S が TLR2 シグナルの下流で NF- κ B の活性化を抑制することにより IgA へのクラススイッチを制御していることも考えられた。

一方今回の DNA マイクロアレイでは、各細胞画分の発現遺伝子プロファイルは既知遺伝子のみならず、多くの未報告遺伝子も含まれている。その中にはワクチンデリバリーの際に標的となり得る候補分子も含まれていると考えられる。つまり、本研究の成果は、ワクチンデリバリーシステムの構築に対して重要な知見を与えるものである。

自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類される。遅期誘導型の遺伝子プロモーターはクロマチン構造が閉じていて、TLR 刺激により構造変換を受け、転写制御因子がアクセスする。一方、

早期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造は常に開いている。このことが、早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子群に分けられるメカニズムであることが考えられる。さらに、遅期誘導型遺伝子プロモーターのクロマチン構造の変換に IκBζeta が関与することも明らかになった。しかし、IκBζeta 自身には、クロマチン構造を変換させる酵素活性はない。IκBζeta と相互作用し、クロマチン構造を変換させる分子の同定をさらに行きたい。このように、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。

さらに腸炎発症における免疫機序の解析をおこなったところ、慢性炎症性腸疾患と深く関わる新たなヘルパーT細胞サブセット Th17 細胞が、腸管粘膜固有層に多数存在しているが、これは腸管粘膜固有層に局在しているユニークな樹状細胞が Th17 細胞分化を常在菌依存性に誘導するためであることが明らかになった。この誘導は、常在菌依存性であるが、TLR 非依存的であり、今後、常在菌由来のどのような因子が Th17 細胞分化を司っているかを明らかにして行きたい。私たちは予備実験でこの細菌因子が ATP であることをつかんでいるが、今後本治療法を用いて、この経路を制御する

方法も考慮する必要がある。

以上、今回の研究において、デキサメサゾン含有 PL-MS の注腸投与がヒトのステロイド抵抗性潰瘍性大腸炎の治療に有効であることが示された。今後、基礎的研究、さらに本法の効果をさらに高める臨床的な検討が必要である。

E. 結論

- (1) 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 PL-MS を作製した。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粒子径に依存し、ターゲティング能という観点から、3 μm 以上 5 μm 以下の粒子が M 細胞へのターゲティングに有効であった。
- (2) 臨床応用を目指したラージスケールでの PL-MS の作製条件について検討し、臨床応用に耐えるクリーンな環境、ラージスケールでの PL-MS の作製体制を構築した。
- (3) PL-MS がターゲットとする M 細胞について、基礎的検討をおこない、パイエル板 M 細胞、絨毛 M 細胞を個々に単離する方法を確立した。さらにパイエル板、絨毛 M 細胞、上皮細胞における発現遺伝子プロファイルが構築

- された。
- (4) パイエル板の M 細胞特異的に発現する PGRP-S がパイエル板 B 細胞における IgA 産生を抑制性に制御して、抗原非特異的な抗体産生を抑制している可能性が示唆された。
 - (5) 自然免疫系の細胞で TLR 刺激により NF- κ B 依存性に発現が誘導される遺伝子は、早期誘導型と遅期誘導型に分類されるが、この相違は各遺伝子プロモーターのクロマチン構造の差によることが明らかとなった。
 - (6) 炎症性腸疾患と深く関る Th17 細胞の発育、維持には常在菌の存在が必須であり、またその効果は TLR 非依存性であることから、Th17 分化における、新たな腸内細菌由来物質の存在が示唆された。今後これらの制御も治療のターゲットとなりうると考えられた。
 - (7) ステロイド含有 PL-MS の効果を高めるために、IL10 発現プラスミドを結合させたカチオン化ゲラチンの同時投与、およびステロイド包埋 PL-MS に *bifidobacterium lognam* を同時に包埋して投与する方法を考案し、動物実験で DSS, TNBS 腸炎に対してその効果を検討した。

その結果ステロイド PL-MS 単独の場合と比較してその腸炎抑制効果はより強力であった。

- (8) デキサメサゾン包埋 PL-MS を用いて 16 例の中等症以上の潰瘍性大腸炎患者に対して治療を行った。4 週間で全員改善を示し、CAI スコアは平均 11.6 点から 6.7 へと改善した。以上からデキサメサゾン PL-MS は、潰瘍性大腸炎患者に対する、より副作用が少なく有効な治療法と考えられた。

F. 健康危険情報

主任研究者、分担研究者も含め、該当する危険情報はなかった。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. 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, Tabata Y, Chiba T: Therapeutic effects of rectal administration of basic fibroblast growth factor on experimental murine colitis. *Gastroenterology* 128:975-86:2005.
2. Watanabe T, Yamori M, Kita T, Chiba T, Wakatsuki Y:

- CD4+CD25+ T cells regulate colonic localization of CD4 T cells reactive to a microbial antigen. *Inflamm Bowel Dis.* 11:541-550:2005.
3. Fujii S, Tominaga K, Kitajima K, Takeda J, Kusaka T, Fujita M, Ichikawa K, Tomita S, Ohkura Y, Ono Y, Imura J, Chiba T, Fujimori T: Methylation of the oestrogen 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.
 4. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Nanakin A, Kanda N, Uenoyama Y, Sawabu T, Hisatsune H, Kusaka T, Ueno S, Nakase H, Seno H, Fujimori T, Chiba T: Possible role of REG Ia protein in ulcerative colitis and colitic cancer. *Gut* 54:1437-1444:2005.
 5. Takagi H, Hiroi T, Yang L, Tada Y, Yuki Y, Takamura K, Ishimitsu R, Kawauchi H, Kiyono H, and Takaiwa F. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 : 17525-17530. 2005.
 6. Kunisawa J, Fukuyama S, and Kiyono H. 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.
 7. Hino A, Fukuyama S, Kataoka K, Kweon MN, Fujihashi K, and Kiyono H. Nasal IL-12p70 DNA prevents and treats intestinal allergic diarrhea. *J. Immunol.* 174 : 7423-7432. 2005.
 8. 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 Kiyono H. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor gamma chain is mediated by IL-6-producing CD4+ T cells. *Gastroenterology* 128 : 922-934. 2005.
 9. Kweon MN, Yamamoto M, Rennert PD, Park EJ, Lee AY, Chang SY, Hiroi T, Nanno M, and Kiyono H. 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.
10. 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).
 11. 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).
 12. 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).
 13. 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).
 14. 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).
 15. 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).
 16. 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).
17. 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).
18. 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-1 β , and TNF- α through nucleotide-binding oligomerization domain 2-mediated signaling in osteoblasts. *J. Immunol.* 175, 1956-1964 (2005).
19. 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).
20. 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).
21. 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).
22. 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).

23. 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).
24. 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).
25. 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).
26. Hirotsani, 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).
27. 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).
28. 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).
29. 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).
30. 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).
31. Takeda, K.: Toll-like receptors and their adaptors in innate immunity. *Cur. Med. Chem. AIAA.* 4, 3-11 (2005).
32. Takeda, K., and Akira, S.: Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17, 1-14 (2005).
33. Takeda, K.: Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.* 11, 51-55 (2005).
34. 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.
35. 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.
36. Nakase H, Nishio A, Tamaki H, Matsuura M, Asada M, Chiba T., Okazaki K: Specific antibodies against recombinant protein of insertion element 900 of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in Japanese patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12:62-69:2006.
37. Kou T, Nakase H, Tamaki H, Kudo T, Nishio A, Chiba T.: Cytomegalovirus infection in patients with ulcerative colitis diagnosed by quantitative real-time PCR analysis. *Dig Dis Sci* 51:1052-1055:2006.
38. Tamaki H, Nakamura H, Nishio A, Nakase H, Ueno S, Uza N, Kido M, Inoue S, Mikami S, Asada M, Kiriya K, Kitamura H, Ohashi S, Fukui T, Kawasaki K, Matsuura M, Ishii Y, Okazaki K, Yodoi J, Chiba T.: Human Thioredoxin-1 Ameliorates Experimental Murine Colitis in Association with Suppressed MIF Production. *Gastroenterology* 131:1110-1121:2006.
39. Uza N, Nakase H, Kuwabara H, Fujii S, Chiba T.: Cecal cancer