

188. 炎症性腸疾患に対するナノテクノロジー創薬

小林 拓

Key words : ナノ粒子, 炎症性腸疾患, タクロリムス,
ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

*北里大学 北里研究所病院 消化器内科

緒 言

炎症性腸疾患 (inflammatory bowel diseases: IBD) とは、クローン病と潰瘍性大腸炎に大別される、主として下部消化管に炎症をきたす、難治性かつ原因不明の疾患である。IBD に対しては今までに数多くの薬物治療が試みられてきたものの、未だ入院治療が必要になったり、治療に反応せず腸管切除を余儀なくされる症例も少なくない。罹患患者は増加の一途を辿っており、若年者に発症が多いこともあり、疾患コントロールが悪ければ、患者のみならず社会全体の損失も少なくない。使用される抗炎症、免疫抑制剤の中には単独もしくは併用による副作用が問題になり、そのために投与が制限され薬剤本来の効果が得られない場合もある。こうした問題を解決するために、本研究では、IBD 治療薬剤の画期的な drug delivery system (DDS) の開発を試みることを目的とした。特に、炎症や腫瘍組織に移行しやすく、マクロファージなどの貪食細胞に取り込まれやすいというナノ粒子の特性を利用して、近年注目されているナノテクノロジー創薬を行うこととした。

我々はこれまでの研究により、マクロファージをはじめとする innate immunity の異常活性化が、acquired immunity の活性化を引き起こして IBD の病態を形成していることを報告してきた¹⁻⁵⁾。これらのことを踏まえ、特にマクロファージの活性化制御をターゲットとしたナノ創薬により、IBD 治療に画期的な進歩をもたらしたいと考えている。今回、タクロリムスとヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 Balinostat のナノ粒子化について検討したため報告する。

方法および結果

本研究で使用する具体的な候補薬剤としては、その機序から、①すでに IBD 臨床で使用されているが副作用のリスクから投与量を制限しなくてはならないもの (6-MP, cyclosporine, FK506 など)、②他疾患で臨床応用されているが IBD での効果が確かでないもの (Am80 など)、③副作用のリスクから臨床応用されていないもの (thalidomide など)、④理論上は有効なはずであるが有意な効果が認められていないか、もしくは研究中なもの (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤など) が有望と考えられるが、今回は、すでにヒト潰瘍性大腸炎に対し有効な治療薬として使用されているものの副作用の懸念が大きく長期使用に適していないタクロリムス、もしくは強力な免疫抑制作用を持つものの多様な細胞腫に対し多様な生命作用が報告されているため副作用の多いヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を本研究でのターゲットとした。

1. ナノ粒子による drug delivery の検討

まずはじめに、蛍光ラベルした、薬剤を封入していないナノ粒子を用い 1.2%デキストラン硫酸ナトリウム自由飲水にて腸炎作製の上、蛍光ラベルしたナノ粒子を静注し、経時的に蛍光顕微鏡で観察した。その結果、①腸炎マウスに静注したナノ粒子は炎症時に集積が増加した。②腸以外への集積は変わらなかった。以上から、マウス生体において、腸炎を発症すると、静脈内投与したナノ粒子が炎症局所 (腸管) に集積しやすく、封入した薬剤の局所へのデリバリーが向上することが期待できると考えられた。

*現所属：北里大学 北里研究所病院 炎症性腸疾患先進治療センター

2. ナノ粒子化タクロリムスの腸炎への有効性の検討

次いで、ヒト潰瘍性大腸炎に有効性が確認され、実際に使用されている免疫抑制剤タクロリムスのナノ粒子化製剤を作製し、実験腸炎モデルで効果を検討した。

1) 急性 DSS 腸炎モデルにおける検討

図 1A のように、1.2%デキストラン硫酸ナトリウムを 6 日間飲水させ、6 日間通常の飲水に戻した上で屠殺し、腸管の状態を確認したが、明らかな効果は認められなかった (図 1B)。

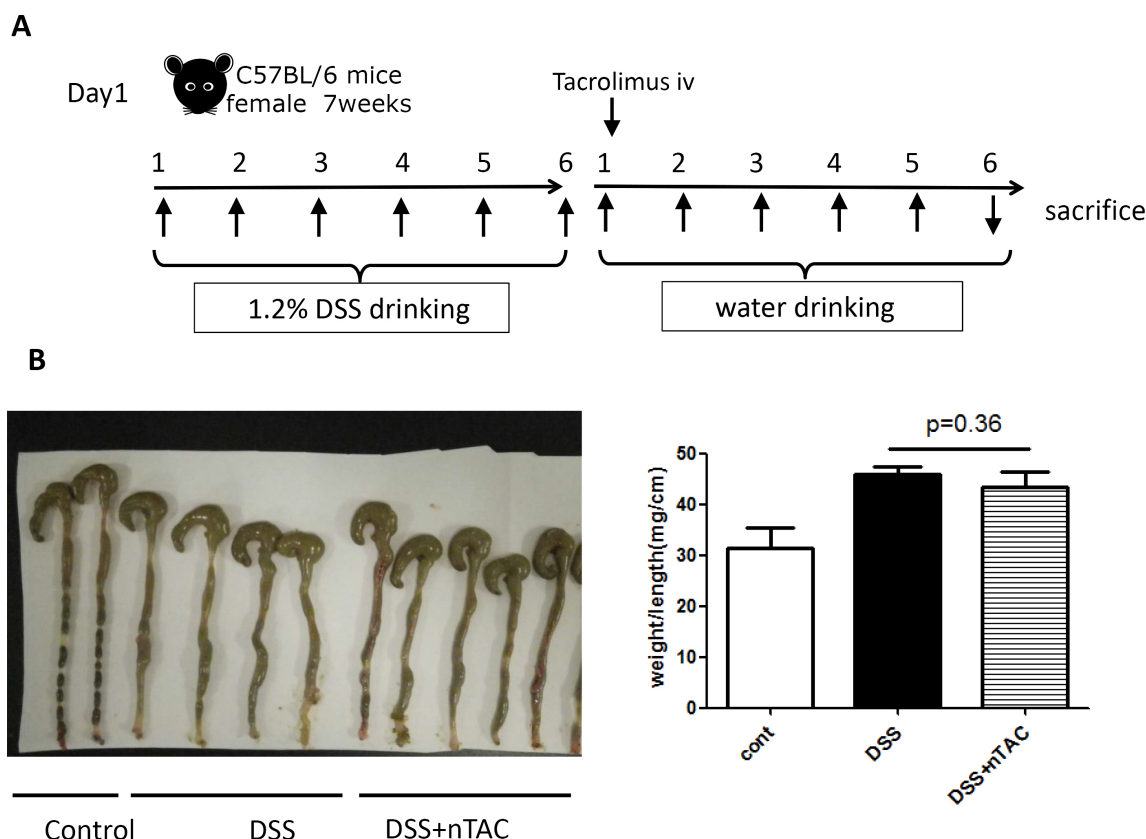


図 1. 急性 DSS 腸炎モデルにおける検討。

急性腸炎モデルでのナノ化タクロリムスの有効性。

2) 慢性 DSS 腸炎モデルにおける検討

次に 1.2%デキストラン硫酸ナトリウムを 6 日間飲水させ、8 日間通常の飲水に戻すことを 3 クール (計 6 週) 繰り返し、慢性腸炎モデルを作製し、ナノ化タクロリムスの有効性を確認した。ナノ粒子化タクロリムスは慢性 DSS 腸炎に対して有効な傾向は認めたが、顕著ではなかった (図 2A)。

3) 骨髄由来マクロファージにおける検討

このため、*in vitro* で骨髄由来マクロファージからの IL-12p40 産生に対するナノ粒子化タクロリムスと非ナノ粒子化タクロリムスを比較した。その結果、ナノ粒子化タクロリムスはマクロファージに効果を示さないということがわかった (図 2B)。食食されやすいナノ粒子製剤の方が有効性が乏しい原因として、タクロリムスの炭素-炭素二重結合が過酸化され不活化することが疑われた。このために、ナノ化タクロリムスはより T 細胞関与の大きいモデルである慢性 DSS で有効性がより大きい傾向が見られるものと思われ、現在 T 細胞移入腸炎モデルでの研究を進めている。

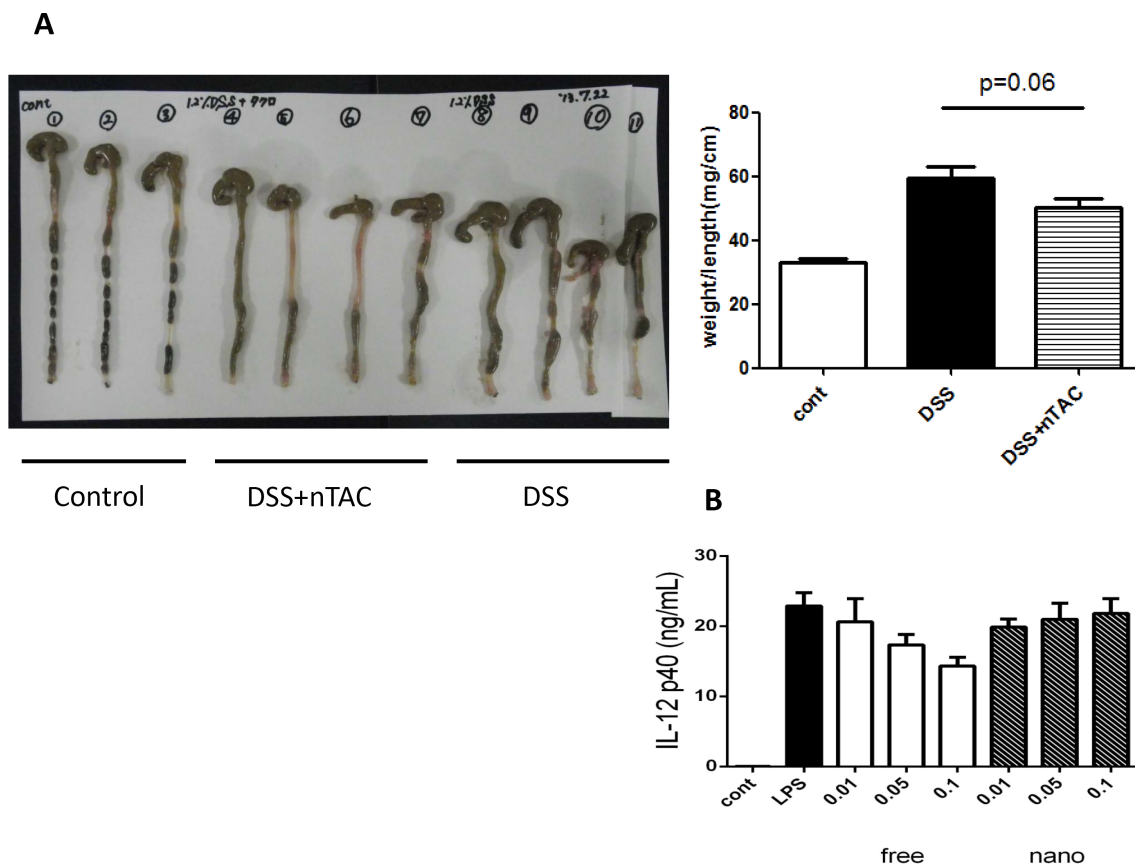


図2. 慢性 DSS 腸炎モデルにおける検討.
慢性腸炎モデルでのナノ化タクロリムスの有効性.

3. ナノ粒子化 HDAC 阻害剤における検討

同様に HDAC 阻害剤を基材としたナノ粒子製剤の制作を試みていた.

1) 骨髄由来マクロファージにおける検討

上記の反省も含め, まず骨髄由来マクロファージにおける有用性をはじめに検討した. サイトカイン IL-12p40 産生抑制効果は, Belinostat でもっとも有効であった (図 3A). *in vitro* ではナノ化, 非ナノ化 belinostat は同様の IL-12p40 産生抑制効果を持っていた (図 3B).

2) 急性 DSS 腸炎モデルにおける検討

デキストラン硫酸ナトリウムを 6 日間飲水させ, 6 日間通常の飲水に戻した上で屠殺し, 腸管の状態を確認したところ, ナノ粒子化 Belinostat は急性 DSS 腸炎に対して有効な傾向を認めており, 現在追試を行っている (図 3C).

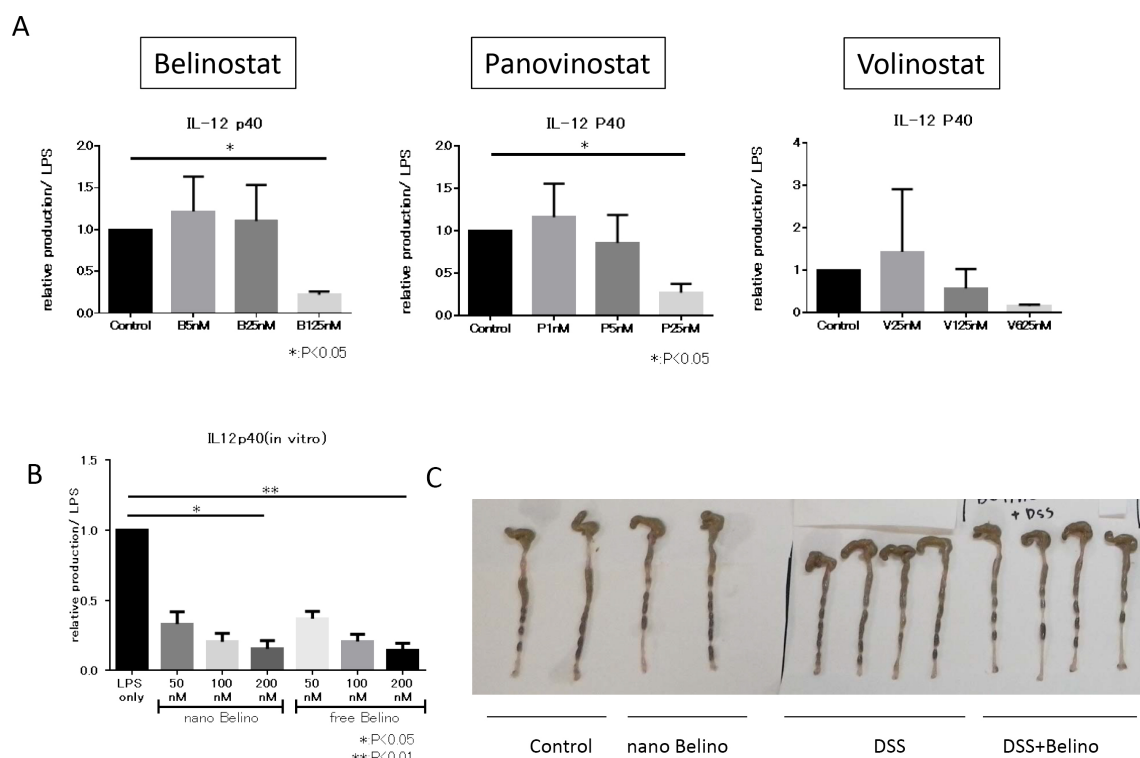


図 3. HDAC 阻害剤の抗炎症効果に関する検討.

Belinostat は *in vitro* で強力な IL-12 p40 の抑制効果を持ち (A), その効果はナノ化, 非ナノ化で同等であった (B). 急性腸炎モデルにおいても腸管短縮の抑制効果を示唆する結果であった (C).

考 察

タクロリムスならびにベリノスタットの双方に対し, ナノ粒子化は技術的に可能であった. タクロリムスはその化学構造から, 食食作用を経て体内に入ること二重結合が阻害されて不活化されてしまうことが新たに分かった. このために, 現在 T 細胞依存性の腸炎モデル (CD45RBhi ナイーブ T 細胞移入モデル) によってナノ化タクロリムスの局所への delivery がアドバンテージとなるかどうか検討している.

一方で HDAC 阻害剤については, 食食による不活化を受けないことが *in vitro* の実験でも確かめられた. 同様に *in vitro* の実験で強力な炎症性サイトカインの抑制効果が確認されたが, 腸炎に対する *in vivo* の有効性は現在検証中である.

共同研究者

本研究の共同研究者は, 北里大学北里研究所病院研究部の竹内 修, 黒沼 智および静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室の浅井知浩である.

文 献

- 1) Kobayashi, T., Okamoto, S., Iwakami, Y., Hisamatsu, T., Nakazawa, A., Chinen, H., Kamada, N., Imai, T., Goto, H. & Hibi, T. : Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm. Bowel Dis.*, **13** : 837-846, 2007.
- 2) Kobayashi, T., Okamoto, S., Hisamatsu, T., Kamada, N., Chinen, H., Saito, R., Kitazume, M. T., Nakazawa, A., Sugita, A., Koganei, K., Isobe, K. & Hibi, T. : IL-23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, **57** : 1682-1689, 2008.
- 3) Kobayashi, T., Matsuoka, K., Sheikh, S. Z., Elloumi, H. Z., Kamada, N., Hisamatsu, T., Hansen, J. J., Doty, K. R., Pope, S. D., Smale, S. T., Hibi, T., Rothman, P. B., Kashiwada, M. & Plevy, S. E. : NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *J. Immunol.*, **186** : 4649-4655, 2011.

- 4) Kobayashi, T., Matsuoka, K., Sheikh, S. Z., Russo, S. M., Mishima, Y., deZoeten, E. F., Karp, C. L., Ting, J. P., Sartor, R. B. & Plevy, S. E. : IL-10 regulates Il12b expression via histone deacetylation: Implications for intestinal macrophage homeostasis. *J. Immunol.*, **189** : 1792-1799, 2012.
- 5) Kobayashi, T., Steinbach, E. C., Russo, S. M., Matsuoka, K., Nochi, T., Maharshak, N., Borst, L. B., Hostager, B., Garcia-Martinez, J. V., Rothman, P. B., Kashiwada, M., Sheikh, S. Z., Murray, P. J. & Plevy, S. E. : NFIL3-deficient mice develop microbiota-dependent, IL-12/23-driven spontaneous colitis. *J. Immunol.*, **192** : 1918-1927, 2014.