

## 87. 免疫制御ナノ粒子「トレロソーム」の創製

長谷 耕二

慶應義塾大学 薬学部 生化学講座

Key words : 酪酸, 大腸炎, トレロソーム, ビタミン D<sub>3</sub>, ナノ粒子

### 緒言

我々の腸管には絶えず無害な食物抗原が流入するとともに、100 兆個にも達する腸内細菌が共生している。こうした無害な抗原に対する免疫応答はエネルギーの浪費であるのみならず、食物アレルギーや炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease : IBD) など発症の原因となる。特に IBD は近年本邦において患者数が増加している。IBD は、クローン病や潰瘍性大腸炎を含む自己免疫疾患の一つで、消化管における長期にわたる慢性炎症を特徴とする。その発症原因は不明であるものの、腸内細菌叢 (マイクロバイオーム) の異常が病態形成に関与していることが示唆されている。これまでに我々を含む多くの研究グループは、IBD 患者の腸内では腸内細菌由来の酪酸産生が健常人と比較して顕著に低下することを見出している [1]。また我々は、酪酸はナイーブ T 細胞のヒストンアセチル化を亢進することで、制御性 T (regulatory T : Treg) 細胞を誘導することを見出している [2]。Treg 細胞は免疫応答の抑制において主要な役割を果たす。それ以外にも酪酸には、分泌型 IgA の産生を高めて粘膜バリア機能を強化する作用や上皮細胞における NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する作用がある。また酪酸は大腸上皮細胞の主要なエネルギー源として使われるが、その際に  $\beta$  酸化が亢進することで管腔内の酸素が消費されて嫌気性環境が構築される。健常人の腸内細菌種の多くは嫌気性菌であることから、酪酸の  $\beta$  酸化は結果的に正常なマイクロバイオームの維持にも貢献している。また嫌気となることで、上皮細胞の HIF-1 $\alpha$  依存的な低酸素応答が誘導されることでタイトジャンクション蛋白質の発現も高まる。以上のように、マイクロバイオームによって産生される酪酸は腸管のバリアを高めて炎症を抑制することで、腸内共生の成立に重要な役割を果たしている。

そこで、IBD 患者に酪酸療法が以前から検討されてきた。しかしながら、酪酸は不快な匂いと味がするため自然な形で摂取は困難であるとともに、経口投与では消化管上部で吸収されて IBD の炎症の場である消化管下部までは到達しない。そこで、直腸洗腸や経口カプセル製剤が開発されてきたものの、臨床試験での酪酸の治療効果には必ずしも一定の見解が得られていない。その理由として、高濃度の酪酸曝露は、腸管上皮の増殖を抑制し、免疫細胞からの炎症性サイトカインの産生を誘導する結果、負の効果をもたらすことが挙げられる。そのため、現在のデリバリーシステムでは、酪酸の管腔内濃度を適切にコントロールすることが困難であり、結果的に酪酸の副作用を誘発する危険性がある。そこで、管腔内濃度をコントロールしながら腸の下部へ酪酸を送達するための新規酪酸ドナーとして、ポリビニル酪酸 (PVBu) を考案した。本研究では PVBu の動態と新規免疫制御ナノ粒子としての PVBu の効果を検証した。

### 方法

#### 1. PVBu ナノ粒子の合成

PVBu は、酪酸ビニル、AIBN、およびアセトンを用いてラジカル重合により合成した。重合溶液をメタノールに対して 48 時間透析した後、ロータリーエバポレーションでメタノールを除去し、凍結乾燥させた。得られたポリマーは、<sup>1</sup>H NMR 分光法によって確認した。続いて、PVBu を含むトルエン溶液に、ビタミン D<sub>3</sub>、または

DiR を添加した。この溶液を、Pluronic F-127 およびアスコルビン酸を含む水溶液に添加した。この 2 相を、ホモジナイザーを用いて混合し、プローブソニケーターで 5 分間超音波処理した。その後、一晚攪拌することにより、溶液からトルエンを蒸発させた。PVBu ナノ粒子へのビタミン D<sub>3</sub> の封入効率は HPLC によって測定した。

## 2. PVBu ナノ粒子の消化管内動態

C57BL/6J 雄性マウスに PVBu-DiR ナノ粒子を経口投与させた。1、3、4 時間後にマウスを安楽死させ、腸を切除して PBS に浸し、IVIS Lumina Imaging system を用いて蛍光測定を行った。盲腸内容物の酪酸濃度は、報告されている方法に従い、ガスクロマトグラフィーにより測定した。

## 3. デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性大腸炎モデル

5 週齢の C57BL/6J 雄マウスに低繊維食を摂取させた。各群 5 匹のマウスに、PVBu ナノ粒子 (酪酸濃度 94 または 190 mM)、PVBu-D<sub>3</sub> ナノ粒子 (酪酸濃度 94 mM、ビタミン D<sub>3</sub> 濃度 5.6 ng/mL)、または酪酸ナトリウム (190 mM) を含む飲料水を 10 日間投与した。3 日目より 9 日目まで、マウスに 2% DSS を飲水投与し大腸炎を誘導した。体重と下痢および大腸出血の重症度に基づく臨床スコアを毎日モニターした。10 日目にマウスを安楽死させた後、結腸を採取してその長さを測定した。

# 結果および考察

## 1. PVBu の作出

AIBN を開始剤としたラジカル重合により、PVBu を調製した。精製した PVBu の<sup>1</sup>H NMR から、不純物が十分に除去されていることが確認された。ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 分析により、M<sub>w</sub> および M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub> はそれぞれ  $1.6 \times 10^4$  および 1.8 であることがわかった。PVBu ナノ粒子は、安定剤として Pluronic F-127 を用いた O/W エマルション法により調製し、一晚攪拌して有機溶媒を蒸発させた。疎水性物質であるビタミン D<sub>3</sub> や標識用蛍光分子を組み込むために、これらの化合物を有機相に溶解して乳化を行った。ビタミン D<sub>3</sub> 封入 PVBu (PVBu-D<sub>3</sub>) ナノ粒子における、ビタミン D<sub>3</sub> の封入効率を測定したところ、 $65.6 \pm 4.0\%$  であった。これらのナノ粒子のサイズは、腸内の炎症性病巣への集積に適した 200 nm 前後に調整された。Pluronic F-127 の表面コーティングにより、表面電荷はほぼ中性であった。PVBu のガラス転移温度は室温以下であるため、凍結乾燥によりナノ粒子同士が融合することが確認された。続いて、PVBu ナノ粒子の水性分散液の 4°C 保存時の安定性を調べたところ、粒子のサイズと PDI は少なくとも 56 日間ほぼ一定であり、PVBu ナノ粒子分散液の高い安定性が示された。

## 2. PVBu ナノ粒子の消化管内滞留と盲腸の酪酸濃度について

マウスに経口投与した蛍光標識ナノ粒子 (PVBu-DiR) の消化管内滞留性を検討した。投与 1 時間後には、DiR の蛍光の大部分は胃と腸で観察され、3 時間後には腸の下部、盲腸、大腸にて観察された。4 時間後には、ほとんどの蛍光が検出されなくなった。このように PVBu ナノ粒子は消化管下部まで分布し、その滞留時間は 4 時間以内であることが判明した。

## 3. PVBu による DSS 誘導性大腸炎改善効果

続いて実験的大腸炎マウスモデルに対する、低用量 (94 mM) または高用量 (190 mM) の PVBu ナノ粒子の治療効果を評価した。比較対照として高用量の酪酸ナトリウムを飲水投与した (図 1A)。実験期間において、飲水量および飼料摂取量は、すべての群においてほぼ一定であった。DSS 誘導性大腸炎では重症度に比例して結腸の短縮が観察されるが、高用量の PVBu ナノ粒子投与群では、同用量の酪酸ナトリウムよりも結腸の短縮を抑制することが判明した (図 1B、C)。これより PVBu は消化管下部に送達されることでより効果的な抗炎症作用を発揮することが示唆された。

続いて、ビタミン D<sub>3</sub> を含む PVBu-D<sub>3</sub> ナノ粒子は、低用量において PVBu ナノ粒子よりも優れた抗炎症効果を示したことから、PVBu とビタミン D<sub>3</sub> の相乗効果が示された。大腸炎に伴う体重の減少は、高用量 PVBu 投

与群と低用量 PVBu-D<sub>3</sub>投与群で抑制された (図 1D)。また、下痢や大腸出血の重症度に基づき評価した臨床スコアにおいても、これら 2 群において有意な改善効果が認められた (図 1E)。

ビタミン D<sub>3</sub>は、核内受容体 (ビタミン D<sub>3</sub>受容体) のリガンドであり、多くの細胞種で様々な遺伝子の発現を調節している。最近の *in vitro* および IBD モデル動物を用いた実験から、ビタミン D<sub>3</sub>は免疫細胞の活性化抑制など複数の経路を通じて IBD の進行抑制に寄与することが判明している。しかし、遊離型ビタミン D<sub>3</sub>は下部消化管には到達しないため、有効なキャリアを用いる必要がある。よって、PVBu-D<sub>3</sub>ナノ粒子は、酪酸の供与体のみならず、ビタミン D<sub>3</sub>を下部消化管に送達するための有効な担体として有効であると言える。

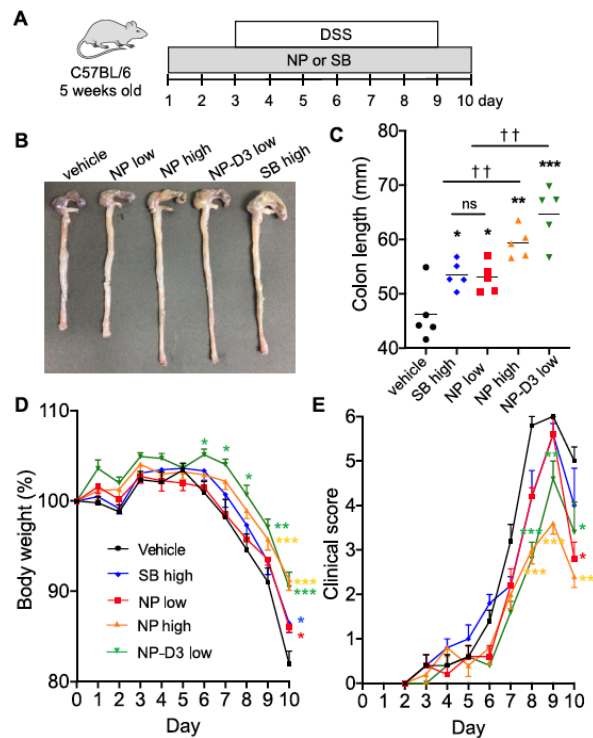


図 1. DSS 誘導性大腸炎における各ナノ粒子製剤の効果

A) 実験スケジュールを示す。

B、C) 10 日目における結腸の長さを示す。

D) 体重変化。

E) 病態スコア。

NP low : 低用量 PVBu ナノ粒子、NP high : 高用量 PVBu ナノ粒子、

NP-D3 low : 低用量ビタミン D<sub>3</sub>含有 PVBu ナノ粒子、SB : 酪酸ナトリウム。

\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001、One-way ANOVA followed by

Dunnnett's test.

### 共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学工学研究院応用化学部門の森健である。

## 文 献

- 1) Yamada T, Hase K. et al., Mucin O-glycans facilitate symbiosynthesis to maintain gut immune homeostasis. *EBioMedicine*. 48:513-525. 2019. PMID: 31521614. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.09.008.
- 2) Furusawa Y, Hase K & \*Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells. *Nature* 504: 446-450, 2013. PMID: 24226770 DOI: 10.1038/nature12721.