

氏名	さきさか ひでと 向坂 秀人		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1871 号		
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 16 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	<b>Topical therapy with antisense tumor necrosis factor alpha using novel <math>\beta</math>-glucan-based drug delivery system ameliorates intestinal inflammation</b> <b>（新規 <math>\beta</math> グルカンベースのドラッグデリバリーシステムを用いたアンチセンス TNF-<math>\alpha</math> による局所投与は腸管の炎症を改善させる）</b>		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	竹下 盛重
	（副査） 福岡大学	教授	今福 信一
	福岡大学	准教授	三宅 勝久

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

炎症性腸疾患（IBD）は消化管の慢性の炎症性疾患である。IBD の病態は複雑だが、腸管免疫系の制御異常が IBD の発症に重要な役割を果たしている。先行研究では、IBD 患者の粘膜で腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) が多く検出され、動物モデルにおいて抗 TNF- $\alpha$  抗体が腸管の炎症を改善し、現在 IBD 患者の治療として広く使用されることとなった。

しかし、IBD 患者の腸管の炎症を改善させ維持するためには高用量の抗 TNF- $\alpha$  抗体が必要であり、それにより結核、リンパ腫、抗 TNF- $\alpha$  抗体に対する中和抗体が発現するなど有害事象の発生率が増加している。このため生物学的製剤を用いた戦略には、IBD における TNF- $\alpha$  をダウンレギュレートするように改善しなければならない。最近の研究では TNF- $\alpha$  の産生を阻害するためにアンチセンスを用いた治療が IBD に有用であると示されているが、それらは経口投与や皮下投与した場合の効果を検討しており、注腸による局所投与の報告は少ない。

$\beta$ -1, 3-グルカンファミリーに属するシゾフィラン（SPG）は中性溶液では 3 重螺旋構造を形成し、アルカリ性溶液では 3 本の単一鎖に変化し、また中性になると、疎水性および水素結合との相互作用を介して、元の 3 重螺旋構造に戻る。この過程中にポリ (dA) で構築されたポリヌクレオチドが存在する場合、元の 3 重螺旋構造に戻らずに 2 本の単一鎖と複合体を形成する。対照的に短いアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) は SPG

と複合体を形成しない。

この研究で、ASO を標的部位に送るために ASO とポリ (dA) を結合させたオリゴヌクレオチドを用いた SPG ベースのドラッグデリバリーシステムを開発した。これらを用いて、アンチセンス TNF- $\alpha$  と SPG の複合体を作製し注腸投与することで IBD マウスモデルに対して治療効果を検討した。

#### 【対象と方法】

IBD マウスモデルとして、生後 8 週齢の C57BL/6 マウスに 3%デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 飲料水を 5 日間投与した。14 日目に大腸を摘出し、大腸炎の重症度および TNF- $\alpha$  とその他の炎症性サイトカインの発現を評価した。次に、DSS 処理マウスから腸管の粘膜固有層(LP)の CD11b 陽性細胞を単離し、その細胞の機能を分析した。さらに、CD11b 陽性細胞がこのアンチセンス TNF- $\alpha$  と SPG からなる複合体を取り込むかどうかを確認するために、フローサイトメトリーを用いた解析を行った。

この複合体の阻害効果を *in vitro* で確認後、DSS 処理マウスに注腸投与し、体重変化、腸管の長さ、内視鏡検査、組織学的検査および炎症性サイトカインの測定を行い大腸炎の重症度を評価した。

量的変数の分析には Student t-test、Mann-Whitney U test を用い、質的変数の分析にはカイ二乗検定を用いて、 $p$  値 $<0.05$  を統計学的有意とした。

#### 【結果】

DSS 処理マウスの大腸粘膜をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) にて測定した結果、TNF- $\alpha$  の他に IL-1 $\beta$ 、IL-6 のような炎症性サイトカインの発現が DSS 未処理マウスと比較して有意に増加した。また、DSS 処理マウスの CD11b 陽性の LP 細胞にリポポリサッカライド (LPS) を加えて培養し、酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA) にて測定したところ、TNF- $\alpha$  の産生が DSS 未処理マウスと比較して有意に高かった。CD11b 陽性細胞が DSS 処理マウスの粘膜で TNF- $\alpha$  を多量に産生していたため、大腸炎を改善させるために CD11b 陽性細胞が産生する TNF- $\alpha$  を標的とした。

Dectin-1 はマクロファージや樹状細胞の病原体パターン認識受容体であり、SPG を含む  $\beta$ -グルカン は Dectin-1 を介して貪食され細胞内に取り込まれる。この Dectin-1 の発現を DSS 処理マウスと DSS 未処理マウスの CD11b 陽性の LP 細胞を蛍光活性化セルソーター (FACS) にて解析したところ、DSS 処理マウスの CD11b 陽性 LP 細胞の Dectin-1 の発現が DSS 未処理マウスと比較して増加していた。このことから、SPG をベースとしたデリバリーシステムは Dectin-1 を介して CD11b 陽性細胞に取り込まれることが想定された。

次に SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  が *in vitro* で CD11b 陽性細胞に取り込まれるかどうかを調べるために、アンチセンス TNF- $\alpha$  と SPG を、それぞれ Alexa Fluor 546 (Alexa 546) と Fluorescein isothiocyanate (FITC) で蛍光標識し、CD11b 陽性細胞に投与して時間別に培養し FACS 解析を行ったところ、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  は時間依存性に

CD11b 陽性細胞に取り込まれ、投与 4 時間では約 40%の細胞に取り込まれた。また、蛍光免疫染色においても SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  群で多数の Alexa 546 および FITC の 2 重陽性の細胞が検出された。この結果より、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  は、SPG と結合していないアンチセンス TNF- $\alpha$  と比較して CD11b 陽性細胞に多量に取り込まれることがわかった。

さらに、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  が CD11b 陽性細胞で TNF- $\alpha$  の産生を阻害するかどうかを調べるために、SPG、アンチセンス TNF- $\alpha$  および SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  をそれぞれ異なる濃度で CD11b 陽性 LP 細胞に加えて培養した後に LPS 刺激を行い、TNF- $\alpha$  の産生量を ELISA にて測定したところ、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  が濃度に依存して TNF- $\alpha$  の産生を阻害した。また、SPG、アンチセンス TNF- $\alpha$  および SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  が Dectin-1 を介して CD11b 陽性細胞を刺激して TNF- $\alpha$  産生を誘導するかどうか調べたが、いずれも TNF- $\alpha$  を産生しないことが示された。

SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  が *in vitro* で TNF- $\alpha$  の産生を阻害することが明らかになったため、*in vivo* で SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  の治療効果を調べるために、DSS 処理マウスに 0.2mg/kg の SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  を週 2 回注腸投与し 14 日目に評価した。SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  を注腸投与した DSS 処理マウスの体重減少および腸管の短縮は有意に抑制された。内視鏡検査でも腸管の浮腫およびびらんは注腸投与後に改善した。組織学的検査でも、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  投与後の粘膜損傷と炎症の有意な改善が示され、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  を投与した大腸の TNF- $\alpha$  および他の炎症性サイトカイン産生も PCR において効果的に抑制し、腸管の炎症を改善した。

### 【結論】

TNF- $\alpha$  の産生は、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  により *in vitro* および *in vivo* の両方で有意に抑制された。SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  による局所治療は腸管の炎症を改善した。また、SPG とアンチセンスを結合させた  $\beta$  グルカンベースのドラッグデリバリーシステムを用いることでより効果的な治療効果を期待することができる。我々の結果は、炎症性腸疾患に対する新たな局所治療法の可能性を示した。

## 審査の結果の要旨

本論文は、炎症性腸疾患 (IBD) に対する新たな治療戦略として、アンチセンス療法を用いた研究である。

IBD モデルマウスとして、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与した DSS 処理マウスを利用した。DSS 処理マウスの腸管粘膜固有層 (LP) の CD11b 陽性細胞が腫瘍壊死因

子 (TNF)- $\alpha$  を著明に発現し、炎症を起こしていた。このため、CD11b 陽性細胞の TNF- $\alpha$  の発現を抑制するために、アンチセンス TNF- $\alpha$  を用いた。

$\beta$ -グルカンであるシゾフィラン (SPG) は中性溶液内で 3 重螺旋構造を呈し、アルカリ性溶液では 1 本鎖となり、また中性になると 3 重螺旋構造に戻る性質を持っている。この戻る過程で、ポリ d(A) を投与すると、複合体を形成する。また、SPG を含む  $\beta$ -グルカンは、マクロファージが発現するパターン認識受容体である Dectin-1 を介してマクロファージに貪食され細胞内に取り込まれる。これらを利用して、SPG にポリ d(A) と結合したアンチセンス TNF- $\alpha$  を加え、SPG ベースのドラッグデリバリーシステムを開発し、DSS 処理マウスに対する治療効果を検討した。

まず、RT-PCR および FACS 解析にて、DSS 処理マウスの腸管粘膜組織および LP の CD11b 陽性細胞で Dectin-1 の発現の増加があることを確認した。次に、蛍光標識を行った SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  を CD11b 陽性細胞に投与したところ、この複合体が CD11b 陽性細胞内に時間依存性に取り込まれた。さらには、ELISA にて SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  が CD11b 陽性細胞の TNF- $\alpha$  の発現を濃度依存性に抑制した。実際に、DSS 処理マウスに SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  を計 4 回注腸投与したところ、DSS 処理マウスの体重減少や腸管の短縮を抑制し、内視鏡検査および組織学的スコアでも改善を認め、腸管粘膜組織の RT-PCR でも TNF- $\alpha$  を含む炎症性サイトカインの発現を有意に抑制した。

以上より *in vitro* および *in vivo* 共に、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  の治療効果を有意に認め、 $\beta$ -グルカンベースのドラッグデリバリーシステムを用いたアンチセンス療法 IBD に対する新たな治療法の可能性が示された。本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さは以下の通りである。

## 1. 斬新さ

従来、中等度～重度の IBD 患者に対して生物学的製剤が使用されている。その中でも抗 TNF- $\alpha$  抗体は、活性化したマクロファージが産生した TNF- $\alpha$  に対して抗 TNF- $\alpha$  抗体を投与することで炎症を改善させる方法である。これに対して、アンチセンス TNF- $\alpha$  はマクロファージの標的 RNA に作用して TNF- $\alpha$  の産生自体を直接抑制する方法である。また、本研究でのアンチセンス TNF- $\alpha$  は SPG を利用することで Dectin-1 を介してマクロファージに効率良く取り込まれた。さらに、抗 TNF- $\alpha$  抗体は高用量の静脈内投与や皮下注射を行うため、結核や悪性腫瘍の発症などの有害事象の発生が問題となっているが、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  を注腸投与による局所に投与するため全身への影響は与えず、抗 TNF- $\alpha$  抗体のように多量のタンパク質を必要としない。このように、本研究において SPG のドラッグデリバリーシステムを用いたアンチセンス TNF- $\alpha$  は IBD における新規の治療薬となる可能性があり、非常に斬新さがある。

## 2. 重要性

現在の本邦の IBD 患者数は年々増加傾向である。IBD の治療法は様々あるが、完治する治療法はなく、寛解状態を長期維持することが非常に重要である。寛解維持効果の高い抗 TNF- $\alpha$  抗体でも長期投与中に効果減弱や疾患の再燃を認め、抗 TNF- $\alpha$  抗体の増量や他の生物学的製剤や治療法の変更が余儀なくされる。このため IBD に対して新たな治療戦略を考えていく必要がある。本研究での TNF- $\alpha$  におけるアンチセンス療法は IBD モデルマウスでも有効であった。IBD 患者に対する SPG ベースのアンチセンス療法の有効性と安全性について検討が必要であるが、本研究に使用した TNF- $\alpha$  に対するアンチセンスだけでなく、その他の炎症に関与されるサイトカインや接着因子などに対するアンチセンスにも応用でき、今後の IBD の新たな治療法として非常に重要であると考えられる。

## 3. 実験方法の正確性

本研究は、久留米大学および福岡大学の動物実験委員会の審査にて承認されたプロトコルに従って実験が行われた。本研究は論文化され、*International Journal of Molecular Sciences* 誌 (インパクトファクター: 4.556) にすでに掲載されており、実験方法の正確性は保たれていると考えられる。

## 4. 表現の明確さ

本研究の目的や実験方法、結果および考察については、論文内に明確に記載されている。特に実験結果は、適切な統計解析にて有意差が示されており、図表にも明確に提示されている。

## 5. 主な質疑応答

Q: DSS 処理マウスは、UC と CD ではどちらのモデルにより近いのか?

A: DSS 処理マウスは UC や CD といった明確な区別はされていないが、DSS 処理マウスは小腸に炎症を起こさず、大腸炎を誘発することから、主に炎症が大腸優位である UC に近いのではないかと考える。

Q: in vivo の体重変化のグラフでは、PBS 投与群でも SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  投与群でも 8 日までは体重が減少しているが、これは仕方ないのか?

A: DSS の投与方法は、各研究で投与期間や投与濃度が異なる。今回の研究では DSS を 5 日間飲水投与し、その後は通常飲料水に変更している。DSS 投与を中止すると、大腸炎が自然に改善し、体重減少も改善していく。SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  投与群では、より早期に体重減少が有意に抑制された。

Q：アンチセンスを他にも入れていいか。アンチセンス TNF- $\alpha$  で炎症を改善したが、他のアンチセンスも一緒に加えたカクテル療法は可能か？

A：治療効果はあると思う。

Q：SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  の注腸投与で体重減少は抑制されたが、より抑制させるにはどうしたらいいか？

A：IBD の治療でのステロイドの注腸剤で、最近フォーム剤が登場した。液体よりも泡であると、炎症のある大腸粘膜により長時間保持できる。SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  が時間依存性に CD11b 陽性細胞に取り込まれたことを考えると、フォーム剤にして炎症のある大腸粘膜に保持できれば、より改善させることができるかもしれない。

Q：ヒトの大腸が長いわけであるが、ヒトに応用する場合は内視鏡中に薬剤を散布したりカプセルを用いたりするのか？

A：IBD の治療薬の 5-ASA 製剤のアサコール®やリアルダ®という薬剤は、pH 依存性カプセルと言われるカプセルの中にメサラジンが入っている。カプセルを内服した後、回腸末端や盲腸で pH が 7 以上になると、カプセルが溶解してメサラジンが放出される仕組みである。このカプセルを利用して、SPG-アンチセンス TNF- $\alpha$  を pH 依存性カプセル内に入れることで、大腸に局所に作用できる。

Q：IBD の分野でアンチセンスを使った先行研究はあるか？

A：ある。SPG はすでにドラックデリバリーシステムとして開発されており、SPG にアンチセンス TNF- $\alpha$  を用いて注腸投与したのは今回が初めての報告である。

Q：今回 14 日で大腸を評価されたが、もっと長くした場合はどうなるか。IBD の場合は慢性の疾患であるから、DSS を長期間投与して評価はしたか？

A：DSS の長期投与の評価はしてない。DSS の投与濃度や投与期間は研究によって様々ある。今回急性腸炎として短期で評価した。DSS を 5 日間投与して中止したため、PBS 投与群も改善している。このまま中止しなければ、体重はもっと減り、その場合マウスが死んでしまう。例えば、DSS を 1% の濃度で長期間投与した状態で観察すれば、結果が大きくなるかもしれない。

Q：IBD の臨床で使うとして、炎症の部位によって投与方法を変える必要があるか？

A：pH 依存性カプセルで投与する場合、例えば直腸炎型の UC であれば、薬剤が直腸の炎症部位まで到達しない可能性もあり、その場合は pH 依存性カプセルよりも注腸投与や坐薬のほうが望ましい。炎症の範囲によって投与方法を変える必要はあるかもしれない。

Q：抗 TNF- $\alpha$  抗体は静脈内投与や皮下注射であるが、今回のようにアンチセンス TNF- $\alpha$  の局所投与ではなく静脈内投与や皮下注射のような全身へ投与することは可能か？

A：可能かと言われれば可能と思われるが、全身に投与すれば抗 TNF- $\alpha$  抗体のように大量のタンパク質が必要なるため、少量で腸管局所に作用させるために注腸投与の方法を選んだ。またアンチセンス TNF- $\alpha$  の皮下注射を行った先行研究はある。

以上の質疑を中心に活発な討議が行われ、申請者は適切に回答した。

本論文は、内容の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さ、質疑応答の結果を踏まえ、審査委員での討議の結果、学位論文に値すると評価された。