

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2016.3) 16:72-76.

平成26年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 長鎖ポリリン酸の鎖長解析技術および腸溶剤化技術の開発

藤谷 幹浩

依 頼 稿 (報告)

平成 26 年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト型研究課題 長鎖ポリリン酸の鎖長解析技術および 腸溶剤化技術の開発

藤 谷 幹 浩*

【研究の背景と目的】

哺乳動物の腸管には 2000 種類以上の細菌が共生し腸管の恒常性維持に必須の役割を担っている。これら腸内細菌叢の異常は、潰瘍性大腸炎やクローン病を含む炎症性腸疾患の発症や重症化と深く関係している¹⁾。細菌の中でも乳酸菌やビフィズス菌、バシラス菌などの宿主に有益なものはプロバイオティクスと呼ばれ、腸管炎症などによる様々な腸管障害を改善することが知られている。我々は、これらの菌から分泌される生理活性物質を同定する技術を確認し²⁾、乳酸菌由来の腸管保護活性物質が長鎖ポリリン酸であることを世界で初めて明らかにした。さらに、この長鎖ポリリン酸には、腸管バリア機能を増強し、炎症性腸疾患モデルにおける腸管障害や過剰な腸管の線維化を著明に改善する作用があることを証明した^{3,4)} (特許第 5526320 号) (特許第 5660508 号)。

この研究成果は、「プロバイオティクス由来の活性物質ポリリン酸を用いた新規炎症性腸疾患治療薬の開発」として文部科学省橋渡し研究加速ネットワークプログラム シーズ B に採択された。現在、3 年以内の非臨床 POC 獲得および平成 27 年度内の臨床試験開始を目標としてプロジェクトが進行中である。一方、その後の研究により、長鎖ポリリン酸の中でも、平均鎖長 100 以上のもののみが薬理作用(腸管障害改善効果)を発揮すること、胃酸などの低 pH によって分解されることを明らかにした。すなわち、この長鎖ポリリン

酸を新規薬剤として臨床応用するにあたり、鎖長解析技術、一定以上の平均鎖長を持つポリリン酸を製造する技術、胃酸に対して分解されずに腸管病変まで到達させる技術、の開発が必須である。そこで本研究では、①ポリリン酸の鎖長解析技術の確立、②一定の鎖長以上の長鎖ポリリン酸を製造する技術の確立、③腸溶化製剤の作成とその作用解析、を目的とした。

【方 法】

1. ポリリン酸の鎖長解析技術の確立

長鎖ポリリン酸および各鎖長のポリリン酸 (Bioenex, JP) の鎖長解析を行った。解析は Toso 0008025 TSKgel GMPWXL (7.8x30cm) カラムを用いた。展開溶媒、流速、試料調整濃度が異なる条件で、HPLC による鎖長解析を行い、最適な測定条件を検討した。さらに、同時再現性や直線性についても検討した。

2. 長鎖ポリリン酸の製造方法 (ラージスケール) の検討

酵素法による長鎖ポリリン酸の製造方法について検討した (図 1)。ヒトへの臨床応用を視野に入れ、反応系に用いるものは全て非動物由来のものとした。また、非動物由来のポリリン酸合成酵素およびピルビン酸キナーゼは独自の合成系で作製した。

3. 腸溶化長鎖ポリリン酸の作用解析

ゼラチンカプセルに長鎖ポリリン酸を封入し腸溶コーティングを行うことで長鎖ポリリン酸の腸溶剤を作成した。ラット DSS 腸炎モデルに経口投与し、腸管

*旭川医科大学 消化器・血液腫瘍制御内科学

改善作用を検討した。腸炎モデルは6週齢ラットにDSS溶液(3%)を5日間自由飲水させ、その後20日間通常の水を飲水させることで作成した。初日から7日間連日腸溶化ポリリン酸を強制投与し7日目に大腸を切除し、ホルマリン固定および蛋白、RNAの回収を行った。蛋白発現の解析にはwestern blottingを、RNAの解析にはRT-PCRを用いた。また、ホルマリン固定した大腸切片はヘマトキシリン-エオジン(Hematoxylin-Eosin; HE)染色を行った。

【結果】

1. ポリリン酸の鎖長解析技術の確立

Toso 0008025 TSKgel GMPWXL (7.8x30cm) カラムを用いて、種々の展開溶媒、流速、試料調整濃度にて鎖長解析を行った結果、以下のような最適条件が明らかになった。

カラム： Toso 0008025 TSKgel GMPWXL (7.8x

30cm)

展開溶媒： 10mM Acetate buffer pH6.0-0.5M NaCl

流速： 500 μl/min

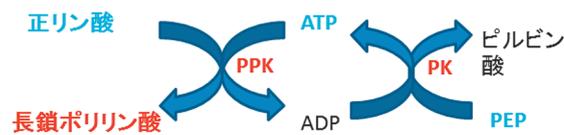
検出： 260nm

試料調整： 20mg/ml (H₂O) を 10 μl

同一サンプルによる同時再現性は極めて良好であった(表1)。また、各濃度における測定の結果、R² = 0.9989と極めて高い直線性を示し(図2)、本条件がポリリン酸の鎖長測定に適していることが示された。

2. 長鎖ポリリン酸の製造方法(ラージスケール)の検討

酵素法による長鎖ポリリン酸製造プロトコルを検討した。反応系に用いられるポリリン酸キナーゼ、ピルビン酸キナーゼは独自の方法で製造を行った。また、材料としてアデノシン二リン酸、ホスホエノールピルビン酸1カリウム塩を用いた。いずれも非動物由来のものを用いた。反応は50Lタンクで行い、随時攪



【ポリリン酸合成反応工程】 反応液200mlのケース

1. バッファーにホスホエノールピルビン酸1カリウム塩(Alfa Aesar社)を添加溶解する。
2. ATP2ナトリウム(オリエンタル酵母社)を添加溶解する。
3. リン酸バッファー、塩化マグネシウムを添加する。
4. 酢酸バッファーを添加する。
5. 精製水で200mlに調整する。
6. 溶液にPPK溶液*、PK溶液**を添加しスターラーで攪拌する。
7. 40℃で16時間加温反応させる(攪拌なし)。

*PPK溶液 (組み替え菌を用いて独自の製造方法を確立した。)

**PK溶液 (組み替え菌を用いた独自の製造方法を確立した。)

図1 酵素伸長反応による長鎖ポリリン酸の精製方法の概要

表1 同時再現性の検討結果(同一サンプルによるUV値)

測定回数	UV値
1	781319
2	785364
3	773401
4	791020
5	779530
Average	782126.8
SD	6578.449
CV(%)	0.8411

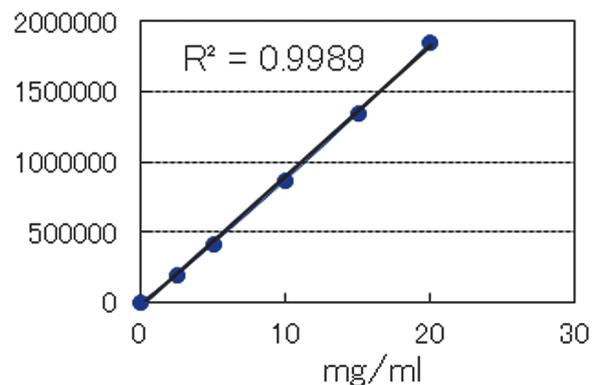


図2 長鎖ポリリン酸の鎖長解析技術による直線性の検討

拌と氷冷を繰り返した。反応時間は17~18時間とした。その後、NaClと中空糸型UF膜を用いて精製し、長鎖ポリリン酸を得た。3ロット試作しHPLCで解析した結果、いずれも十分な鎖長で、同様の波形を示しており、再現性の高い製造方法であると考えられた(図3)。

3. 腸溶化長鎖ポリリン酸の作用解析

長鎖ポリリン酸を人工胃液(塩化ナトリウム2.0g + 塩酸7.0ml + H₂O 1000ml)に加え、HPLCおよび電気泳動にて鎖長解析を行った結果、短時間で短鎖化することが明らかになった(図4)。そこで【方法】で述べたように腸溶化長鎖ポリリン酸を作製し、ラット腸炎

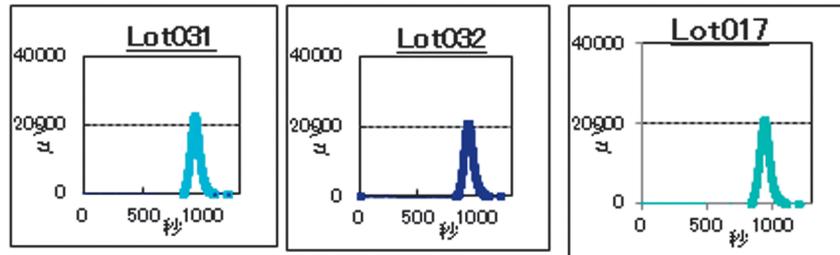


図3 長鎖ポリリン酸のロット毎の鎖長分析結果

ポリリン酸 10mg/ml(精製水)溶液を調製、37°Cで人工胃液混和。

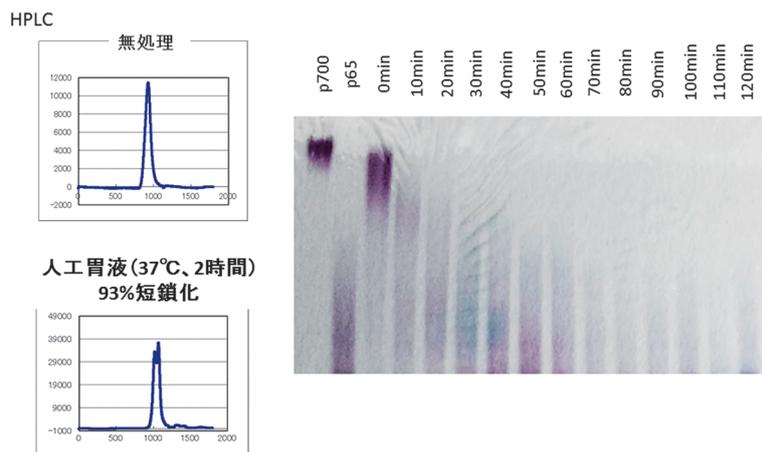


図4 人工胃液によるポリリン酸の短鎖化

—腸管長—

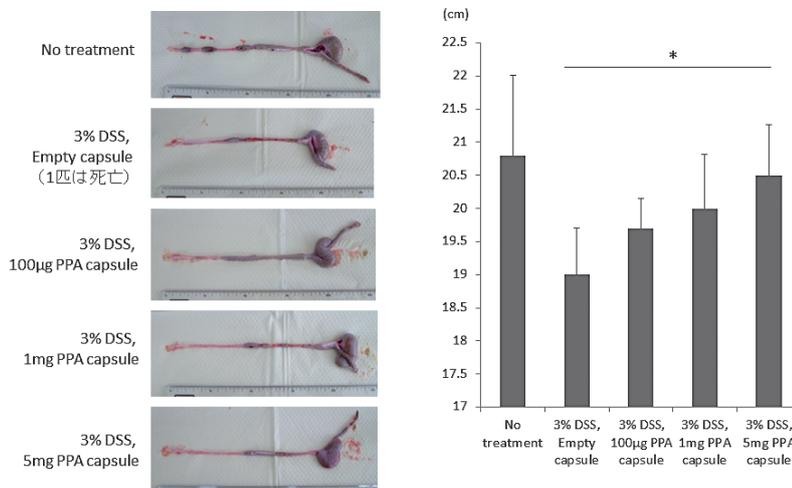


図5 腸溶化長鎖ポリリン酸の経口投与による腸管長の変化(ラットDSS腸炎モデル)

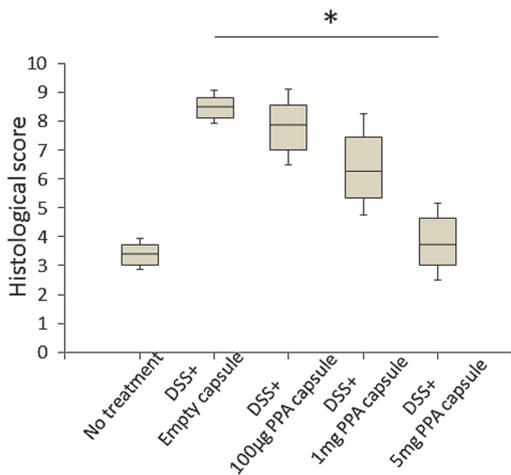
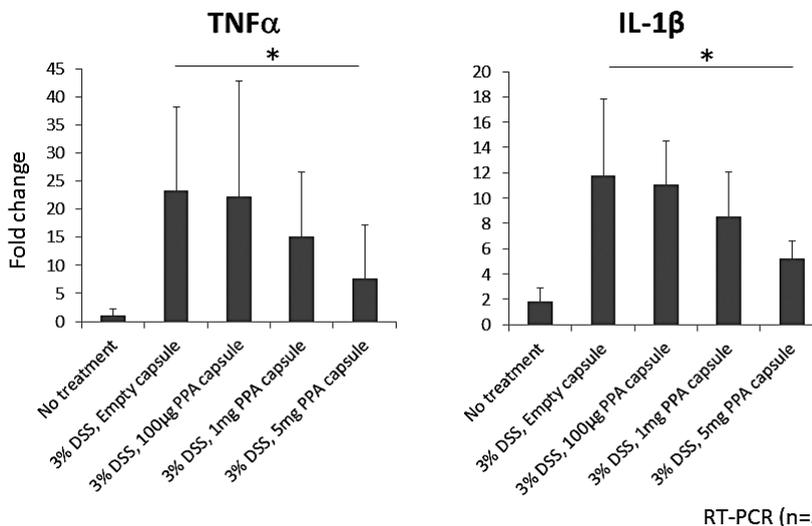


図6 腸溶化長鎖ポリリン酸の経口投与による組織学的炎症所見の変化 (ラット DSS 腸炎モデル)

モデルに7日間経口投与を行った。その結果、腸管長の短縮 (図5) および組織学的炎症所見 (図6) は濃度依存性に改善した。また、腸管組織中の炎症性サイトカイン (TNF β 、IL-1 β) の過剰発現も濃度依存性に低下した (図7)。一方、腸溶化していない長鎖ポリリン酸を経口投与しても組織学的改善は得られなかった (図8)。以上から、長鎖ポリリン酸の腸溶化経口剤はラット腸炎モデルの改善に有用であった (特許申請準備中)。

【考 察】

本研究によって、長鎖ポリリン酸の評価系が構築され、ラージスケールでの製造法が確立した。また、腸溶コーティングを用いて製造した腸溶化長鎖ポリリン



RT-PCR (n=5 or 6)

図7 腸溶化長鎖ポリリン酸の経口投与による炎症性サイトカインの発現変化 (ラット DSS 腸炎モデル)

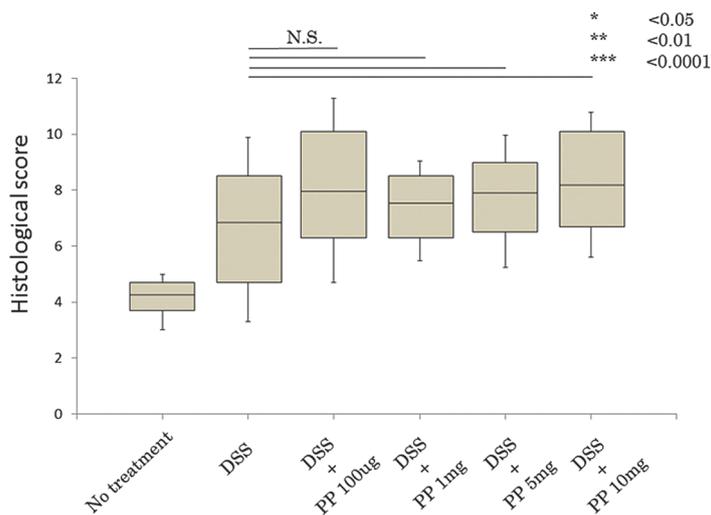


図8 長鎖ポリリン酸 (原薬) の経口投与による組織学的炎症所見の変化 (ラット DSS 腸炎モデル)

酸の経口投与はラット腸炎モデルの腸管障害を有意に改善した。以上から、長鎖ポリリン酸を用いた新規炎症性腸疾患治療薬の開発プロジェクトにおいて大きなハードルであった原薬の製造や評価方法の確立、腸溶化経口剤の有効性検証に関する基盤的な研究成果が得られた。

潰瘍性大腸炎やクローン病に代表される炎症性腸疾患は、原因不明の難治性疾患であり根治治療はない。活動期には炎症性サイトカインである TNF β 、IL-1 β の増加が認められ、これらのサイトカインは本疾患の治療標的と考えられている⁹⁾。本研究に用いたラット腸炎モデルでもこれらのサイトカインが過剰発現しており、炎症性腸疾患のよいモデルであることが示唆される。このモデルに対し腸溶化長鎖ポリリン酸の経口投与が腸管短縮や炎症性サイトカインの発現を強く抑制することが証明できた。よって腸溶化長鎖ポリリン酸は、炎症性腸疾患治療における新規の経口剤として臨床応用が可能であると考えられる。

長鎖ポリリン酸を臨床応用するにあたって、薬剤としての安定性や安全性、体内動態について明らかにする必要がある。本研究と並行して、長鎖ポリリン酸の安定性、催腫瘍作用、体内動態についても検討を行っており、現在、信頼性基準での前臨床試験を行っている。また、GMP 準拠を原則としたポリリン酸製造ラインの確保や製剤化、出荷と保存の体制もほぼ構築で

きている。今後、医薬品医療機器総合機構 (PMDA) との薬事相談および臨床試験計画の承認へ向けて、本研究成果を発展させていきたい。

【文 献】

- 1) Devkota S, Wang Y, Musch MW, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10-/- mice. *Nature* 2012 ; 487 : 104-8.
- 2) Fujiya M, Musch MW, Nakagawa Y, et al. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell Host Microbe* 2007;1:299-308.
- 3) Ueno N, Fujiya M, Segawa S, et al. Heat-killed body of *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17: 2235-50.
- 4) Segawa S, Fujiya M, Konishi H, et al. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One* 2011 ; 6 : e23278.
- 5) Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014 ; 14 : 329-42.