

AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:99-102.

平成25 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精密鎖長解析技術の開発と腸炎改善作用の解析

藤谷 幹浩

依頼稿 (報告)

平成 25 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 長鎖ポリリン酸の精密鎖長解析技術の開発と 腸炎改善作用の解析

藤 谷 幹 浩*

【研究の背景と目的】

哺乳動物の腸管には 800 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おり、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、腸管炎症による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立し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 (特許第 5190849 号)。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) (特願 2010-089469、PCT/JP2011/057689)。

これらの研究により、乳酸菌由来の長鎖ポリリン酸を用いた新規炎症性腸疾患治療薬開発への基盤的成果が得られた。この研究成果は、炎症性腸疾患に対する新規治療薬開発プロジェクト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 の獲得および平成 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

十分な薬理作用 (腸管障害改善効果) を発揮することを明らかにした。したがって、この長鎖ポリリン酸を GMP 基準に準じた新規薬剤として臨床応用するにあたり、一定の鎖長の範囲に限定した長鎖ポリリン酸を、再現性を持って製造することが必須である。そこで本研究では、ポリリン酸の合成方法や鎖長解析技術を確立し、各鎖長のポリリン酸の腸管障害改善作用について明らかにすることを目的とする。

【方法】

1. 長鎖ポリリン酸の精製

ポリリン酸の合成方法として菌体成分から精製する方法と酵素伸長反応により化学的に合成する方法がある。この両者について、純度、合成ポリリン酸の鎖長を比較検討した。

2. ポリリン酸の鎖長解析技術の確立

1. で合成した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。解析方法として、電気泳動法および HPLC を用い、その精度や再現性について検討した。

3. 長鎖ポリリン酸の腸管障害改善作用の解析

1. で合成した長鎖ポリリン酸および各鎖長のポリリン酸を用いて腸管障害改善作用を検討した。
①マウス摘出腸管を用いた *ex vivo* のマンニトール漏出試験 (腸管バリア機能試験)
マウスの小腸を摘出し、腸管内にポリリン酸を投与して両端を結紮し、37℃、2 時間、RPMI 中でインキ

*旭川医科大学 消化器・血液腫瘍制御内科学

ユベートした。その後、腸管内のポリリン酸を洗浄して、モノクロラミン (NH₂Cl) および ³H 標識マンニトールを腸管内に注入し、同様に RPMI 中でインキュベートした。経時的に腸管外 (培養上清中) に漏出する ³H 標識マンニトールを測定した。

②マウス DSS 腸炎モデルによる肉眼的、組織学的な変化

6 週齢の C57Bl/6 マウスに 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 DSS 慢性腸炎モデルを作成した⁵⁾。このモデルでは、19 日目以降に線維化が完成されることが示されている⁶⁾。実験開始後 25 日目より 10 日間連日 100 μg/ml のポリリン酸溶液 100 μl または 100 μl のリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) を経肛門的に注腸投与し、35 日目で蛋白と RNA を回収した。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、切除した大腸切片をホルマリン固定し、ヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin; HE) 染色と蛍光免疫染色を行った。

【結果】

1. 長鎖ポリリン酸の精製

菌体成分からポリリン酸を精製する方法 (図 1) および酵素伸長反応により化学的に合成する方法 (図 2) を確立し、両者について比較検討した。その結果、菌体成分からの抽出方法ではポリリン酸の純度が低く、臨床応用は困難であることが明らかになった。一方、酵素伸長反応による合成方法では高純度で長鎖のポリリン酸が合成できることを突き止めた。さらに、独自

1. ポリリン酸高蓄積乳酸菌株の選別
2. ポリリン酸の高蓄積環境の設定
3. 高温短時間殺菌処理による滅菌 (140℃ 30秒処理)
4. 物理的破碎による菌体破壊 (ガラスビーズ破碎機)
5. 長鎖ポリリン酸の精製回収 (弱塩基性陰イオン交換樹脂)

ポリリン酸の製造方法 (特願2012-107433)

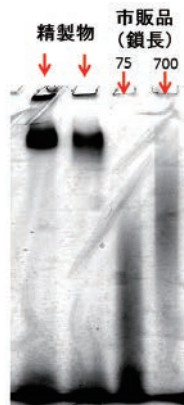


図 1 菌体成分からの長鎖ポリリン酸の精製方法

のポリリン酸合成酵素の精製方法を確立し、その後のポリリン酸の合成に用いた。

2. ポリリン酸の鎖長解析技術の確立

ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法によるポリリン酸の鎖長解析結果を示す (図 3)。鎖長の差によって、明らかにことなったバンドを認める。また、合成したポリリン酸の鎖長は幅広く分布している可能性が示された。

分子量カラムを用いた HPLC による鎖長解析を行った (HPLC の解析条件については後日公表する予定である)。HPLC では、波形やリテンションタイムによりポリリン酸の平均鎖長や分布を定量的に解析できることが明らかになった。本研究で開発した方法を用

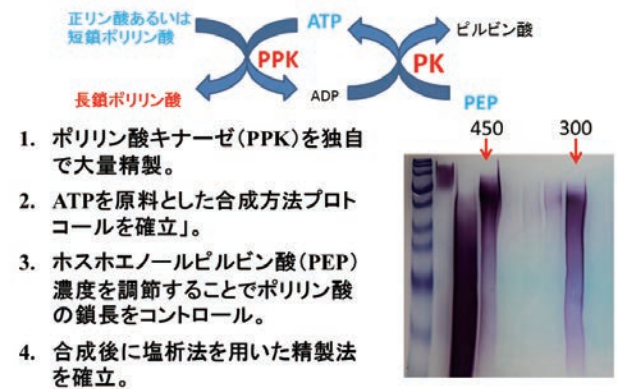


図 2 酵素伸長反応による長鎖ポリリン酸の製造方法

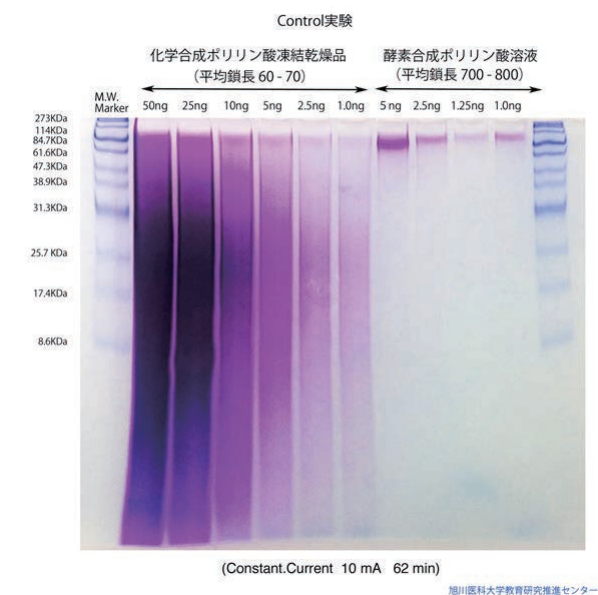


図 3 ポリアクリルアミドゲルを用いたポリリン酸の電気泳動

いて合成した6ロットの長鎖ポリリン酸を解析した結果、全ロットのUVスペクトル、HPLCの波形およびリテンションタイム、はほぼ同じであった。よって、本研究で開発した合成方法を用いると、非常に高い再現性をもって長鎖ポリリン酸が合成できるものと考えられた。

3. 長鎖ポリリン酸の腸管障害改善作用の解析

長鎖ポリリン酸の腸管バリア機能に対する作用について、*ex vivo*のマンニトール漏出試験を用いて検討した(図4)。4ロットの長鎖ポリリン酸およびPBSにて前処理した腸管をNH₂Clによって酸化ストレス下に置き、経時的に腸管外漏出マンニトール量を測定した。その結果、コントロールと比較して、全てのロットの長鎖ポリリン酸において、漏出マンニトールの量が有意に減少していた。したがって、長鎖ポリリン酸は腸管バリア機能を増強する作用を持つことが明らかになった。

DSS慢性腸炎モデルに対して長鎖ポリリン酸を投与した結果、腸管の短縮は軽減され、組織学的な炎症所見は改善し、線維化の程度やコラーゲンの発現も減少した。コントロール群で増加していた炎症性サイトカインTNF α 、IL-1 β 、IFN γ の発現は、長鎖ポリリン酸の投与によって減少した。同様に線維化関連メディエーターであるTGF β やCTGFも長鎖ポリリン酸によって減少した。

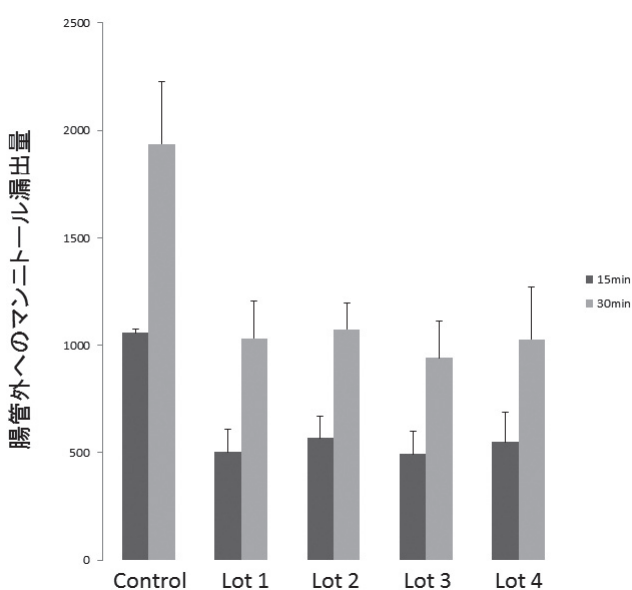


図4 長鎖ポリリン酸のUVスペクトル(本研究で合成した6ロットの検討)

【考察】

本研究によって、長鎖ポリリン酸の安定した合成方法が確立し、HPLCによる評価にて合成物の再現性が証明された。また、これら長鎖ポリリン酸は腸管バリア機能の改善作用、慢性腸炎に対する抗炎症作用、線維化改善作用などの薬効を持つことが明らかになった。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ける、GMP準拠の原薬製造や評価方法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、根治治療は確立されていない。炎症の活動期には、炎症性サイトカインであるTNF α 、IL-1 β 、IFN γ の増加が認められ、炎症の程度と一定の相関があることが知られており、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⁷⁾。本研究に用いたマウス慢性腸炎モデルでは、炎症性腸疾患患者と同様にこれらのサイトカインが過剰発現しており、長鎖ポリリン酸によってこれらの発現が強く抑制されることが証明できた。同様に炎症性腸疾患患者で増加している線維化関連メディエーターについても抑制されることから、長鎖ポリリン酸は炎症性腸疾患における抗炎症、抗線維化薬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、人工胃液や腸液、高温環境に対する長鎖ポリリン酸の安定性、催腫瘍作用の有無の検証、³²P標識ポリリン酸を用いた長鎖ポリリン酸の体内動態の検討を行っており、信頼性基準での前臨床試験へ向けた準備を行っている。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、出荷と保存の体制を整備中である。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) Melgar S, Karlsson A, Michaelsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1328-38.
- 6) Yamaguchi H, Suzuki K, Nagata M, et al. Irsogladine maleate ameliorates inflammation and fibrosis in mice with chronic colitis induced by dextran sulfate sodium. *Med Mol Morphol* 2012;45:140-51.
- 7) Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014;14:329-42.