

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590697

研究課題名（和文） Dectin-1 を介した樹状細胞制御に基づく炎症性腸疾患の病態解明と治療薬の開発

研究課題名（英文） Development of new therapeutic agents for inflammatory bowel disease based on the dendritic cell regulation via Dectin-1

研究代表者

藤山 佳秀 (FUJIYAMA YOSHIHIDE)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：70111896

研究成果の概要（和文）：

樹状細胞は炎症性腸疾患などの免疫異常をきたす疾患において重要な役割を果たしている。Schizophyllan(SPG)は DNA 塩基配列の担体として使用可能で、樹状細胞などに発現する Dectin-1 を介して DNA 塩基配列を細胞内に導入することが可能である。このドラッグデリバリーシステムを応用し炎症性腸疾患の新しい治療薬の開発を目指す事とした。しかしながら IL-23p19、IL-27p28、NF-kB をターゲットとした検討では、十分な腸炎抑制効果は得ることができなかった。

研究成果の概要（英文）：

Dendritic cells are known to play an important role in inflammatory bowel diseases. Schizophyllan can be used as a transporter of DNA sequence into cytoplasm via Dectin-1 which is expressed on the surface of dendritic cells. We have investigated the application of this drug delivery system focusing on IL-23p19, IL-27p28 and NF-kB decoy. However, it was not possible to obtain sufficient suppression effect of experimental models of colitis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2012年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科学臨床医学・消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患、Dectin-1、schizophyllan、ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

我々は以前より IL-17 に注目し炎症性腸疾患の病態解明と治療法の開発を目指し研究を進めてきた。近年、炎症性腸疾患に中心的な役割を果たすと考えられるリンパ球サブセットとして Th-17 細胞という概念が提唱

され、その誘導には樹状細胞から分泌される IL-23 が必要と考えられている。特に樹状細胞が IL-23/IL-17 axis の中心的な役割を果たしていると考えられる。

また、一方で樹状細胞などに発現する Dectin-1 依存性に Schizophyllan(SPG)とい

う β -1,3-D-gulcan を担体としアンチセンス DNA 塩基配列を細胞内に導入することが可能であるため、このドラッグデリバリーシステムを応用し炎症性腸疾患の新しい治療薬の開発を目指す事とした。

2. 研究の目的

Dectin-1 を介し、Schizophyllan(SPG) という β -1,3-D-gulcan を担体としアンチセンス DNA 塩基配列を樹状細胞内に導入し炎症性腸疾患の新しい治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) アンチセンス・SPG 複合体作製

- ① SPG を 0.25N の NaOH に溶かし(1本鎖にするため) 2 日ほど放置
- ② DNA 溶液(water)と 1 M Tris buffer (pH=7.6)を混和後、攪拌
- ③ SPG/NaOH 溶液を添加し攪拌する vortex し、完全に混合後、4°C で静置

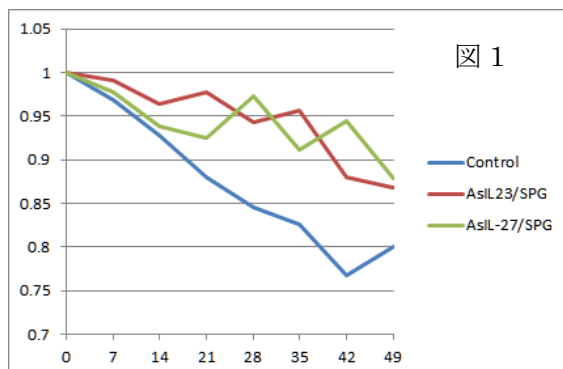
(2) アンチセンスの設計

以下の 3 種類の核酸配列を設計

- ① IL-27p28
CCTCCTCTTCCTCTTCCTCCTA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
- ② IL-23p19
GTCTCTTCATCCTCTTCTTCTAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
- ③ NF-kB decoy
AGTTGAGGGGACTTTCCCAGG
CAAAAGCCTGGGAAAGTCCCCT
CAACTAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
A

(3) 腸炎モデルの作製

- ① 急性腸炎モデル
雌性 C57/BL6 マウスに 3% dextran sodium sulfate を自由飲水にて投与。5 日後に蒸留水に変更し 14 日後まで体重変化を記録。14 日後に屠殺し腸管重量や長さなどを検討した。
- ② 慢性腸炎モデル
Rag2KO マウスへの IL-10KO マウス由来リンパ球移入モデルの作製を

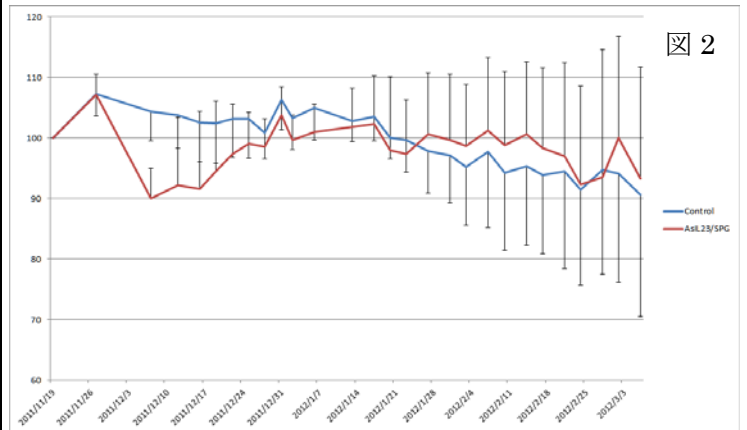


行った。IL-10KO マウスから脾臓と腸間膜リンパ節を摘出。得られた白血球分画より CD4 陽性細胞を MACS により単離。1x10⁶個の細胞を Rag2KO マウスに移入することにより比較的均一な腸炎を得ることができた。

4. 研究成果

(1) アンチセンス・SPG 複合体の比較

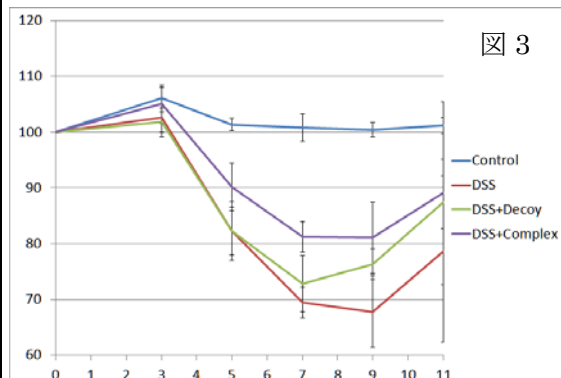
我々は以前ケモカインの一種である Macrophage-migration inhibitory factor に対するアンチセンス DNA と SPG との複合体投与の検討を行っている。その結果、アンチセンス・SPG 複合体の投与量として 0.01mg/kg の隔日投与により腸炎抑制効果を確認できた (Mol Ther 2012 20:1234)。よって、この検討をもとに慢性腸炎モデルに対し、IL-23p19 と IL-27p28 の 0.01mg/kg 隔日投与の効果について比較検討を行った。コントロール群、IL-23p19/SPG 複



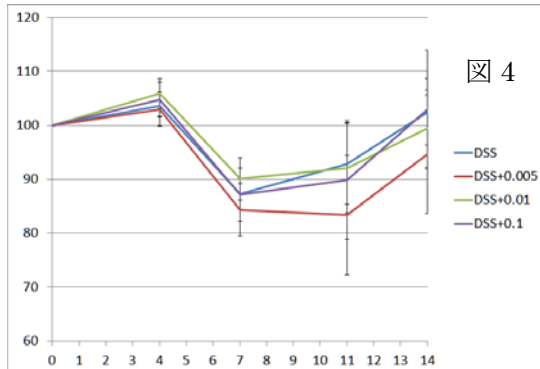
合体投与群、IL-27p28/SPG 複合体投与群の計 3 群、n=4 で検討を行った。図 1 に示すようにアンチセンス・SPG 複合体投与群においていずれも DSS 単独投与群と比較し体重減少は軽度であった。

(2) アンチセンス IL-23p19/SPG 複合体の慢性腸炎モデルへの長期投与

アンチセンス IL-23p19/SPG 複合体の効果を実験的に検討するために、慢性腸炎モデルを用い、約 3 ヶ月程度経過観察を



行った。検討はコントロール群、アンチセンス IL-23p19/SPG 複合体投与群、SPG 単独投与群、アンチセンス IL-23p19 単独投与群の計 4 群、n=6 にて検討した。同様の実験を繰り返し行ったが、一定の結果が得られなかった。図 2 にコントロール群とアンチセンス IL-23p19/SPG 複合体投与群の体重変化



のみを示す。

(3) 急性腸炎モデルに対する NF-kB decoy/SPG 複合体の効果検討

DSS 腸炎モデルを作製し、コントロール群、DSS 単独投与群、DSS+NF-kB 投与群、DSS+ NF-kB decoy/SPG 複合体投与群の計 4 群、n=6 で検討を加えた。4 群の体重変化は以下の様であり、図 3 に示すように DSS+ NF-kB decoy/SPG 複合体投与群がもっとも体重減少が軽度であった。

以上の結果を得たため、DSS+ NF-kB decoy/SPG 複合体の投与量を最適化する目的で、DSS+ NF-kB decoy/SPG 複合体の投与量を 0.005mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg の 3 群にコントロール群を加えた計 4 群、n=6 で検討を加えた。4 群の体重変化は以下の様であり、図 4 に示すように一定の結果を得ることができなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

特記すべきことなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤山 佳秀 (FUJIYAMA YOSHIHIDE)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70111896

(2) 研究分担者

安藤 朗 (ANDOH AKIRA)

滋賀医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号: 90252395

馬場 重樹 (BAMBA SHIGEKI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号: 40422901

(3) 連携研究者

()

研究者番号: