



# Development of Drug Delivery System for Apigenin against Inflammatory Disease : Approach for Clinical Application of Natural Products

著者	山? 緑
発行年	2019
その他のタイトル	ドラッグデリバリーシステムによるアピゲニンの抗炎症効果の向上
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2019
報告番号	12102甲第9291号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00158122">http://hdl.handle.net/2241/00158122</a>

氏名	山崎 緑
学位の種類	博士 (環境学)
学位記番号	博 甲 第 9 2 9 1 号
学位授与年月日	令和元年 9 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Development of Drug Delivery System for Apigenin against Inflammatory Disease - Approach for Clinical Application of Natural Products - (ドラッグデリバリーシステムによるアピゲニンの抗炎症効果の向上)
主査	筑波大学教授 博士 (農学) 磯田 博子
副査	筑波大学教授 博士 (農学) 張 振亜
副査	筑波大学准教授 博士 (農学) 宮前 友策
副査	筑波大学准教授 博士 (農学) Myra O. Villareal

## 論 文 の 要 旨

本研究の背景として、天然物由来の薬効成分の薬理作用増強に向けた取り組みがあり、著者は、環境因子が深く関与する炎症性疾患に天然物由来薬効成分の有効性を試みる目的で研究を行った。

第 1 章で著者は、環境因子が惹起する疾病の 1 つとして炎症性腸疾患(以下 IBD)を紹介した。IBD はクローン病と潰瘍性大腸炎の 2 種類に分類され、どちらも難治性疾患であり患者数は世界で数百万人いるとされる。IBD 病態に関与する因子として喫煙や食生活、抗生物質の不適切な使用などがその環境因子として挙げられる。一方で他の研究報告からは、腸内細菌叢が IBD の病因としてフォーカスされ、幼少期の抗生物質の乱用が腸内細菌叢の多様性を低下させ IBD 発症の一因となっていることが問題提起されている。IBD の標準治療薬に関しては IBD の再発例では時として効果が限定的なことや副作用や薬価が問題となる場合がある。既存の研究において、植物フラボノイドの 1 種 Apigenin の抗腫瘍作用、分化促進能、抗炎症効果などが報告されている。その薬効メカニズムとして TNF- $\alpha$  および AKT パスウェイ阻害作用が証明されている。また別のグループの報告からは Apigenin には IBD の改善作用があること、また上述のような直接的保護作用を有するだけでなく Apigenin は腸内細菌叢の調節作用も有しており、クロストリジウム属の一部を減少させバクテロイデス属の一部増加させることで粘膜保護的な作用を有する代謝物を産生し、間接的な IBD 改善作用も有することが過去の報告から明らかとなっている。このように天然物由来成分の中には多彩な薬理作用をもつ物質が多い一方で薬物動態や安定性の面で課題を有する化合物も多いことから、著者は、より選択的に治療効果を発揮させるための製剤化の必要性を提起した。Apigenin は多様な薬理作用を持つ一方で、経口投与での生物学的利用能が低く水への溶解性が悪いなどの問題点から、臨床応用には製剤化が必須であると考えられた。

第 2 章で著者は、薬物送達システム(以下 DDS)とその製剤の目的部位への到達メカニズムについてモノクロタリン肺傷害ラットモデルを用いて検討した。DDS の代表的な例として Liposome(以下 LS)があるが、

本研究では血管透過性評価試薬として蛍光標識アルブミンを用いて、蛍光標識 LS 集積と血管透過性の関連性を評価した。その結果、著者は、本製剤を静脈内に投与すると蛍光標識 LS 集積強度と血管透過性強度が有意に相関したことから本製剤は **Enhanced permeability and retention** 効果を通じて、肺の組織傷害部位に選択的に集積することを示した。

第 3 章で著者は、T 細胞移入大腸炎マウスモデルを用いて蛍光標識 LS 集積と大腸炎スコアの関連性を評価した。その結果、本製剤集積と大腸炎スコアは有意に相関しており、また活性窒素酸素種検出試薬の L-012 を用いた検討において、蛍光標識 LS 集積と傷害部位がほぼ一致していることを確認した。さらに過去の文献報告において DDS 製剤を取り込む細胞の 1 つとしてマクロファージ(以下 M $\phi$ )が有力であると示唆されていることから、蛍光標識 LS 集積強度と大腸炎組織中の M $\phi$  マーカーの遺伝子発現強度の相関性を確認した結果、有意に正の相関を示した。以上の結果から、著者は、本製剤を用いることで薬剤を目的送達部位に特異的に送達可能であり、さらに特に M $\phi$  が関与する疾患において本製剤の利点が発揮できるのではないかということを示した。

第 4 章で著者は、1 章で必要性を論じた Apigenin の製剤化の実現可能性について、製剤化検討およびマウス M $\phi$  由来 RAW264.7 細胞を用いた薬効評価を行った。Apigenin は水溶性溶媒中では析出が認められるがカチオン性脂質を用いてナノパーティクル (NP) 化すると水系溶媒中で Apigenin を分散可能であること、また製剤化した DDS は製剤化前の溶液と比較して RAW264.7 細胞において IL-1 $\beta$ 、IL-6 および TNF- $\alpha$ 等の炎症関連マーカー関連遺伝子発現抑制作用が強力であることを見出した。さらに炎症性サイトカイン産生を増強させ、炎症を増悪させる作用のあるインフラマソームの構成成分 NOD like receptor protein3 (Nlrp3)においても、遺伝子発現解析にて Apigenin および Apigenin NP の抑制作用を確認した。IBD に対する炎症改善作用の他、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6 および Nlrp3 が関与する病態としてエリテマトーデスやリウマチなどの報告があることから、Apigenin および Apigenin NP はこれらの難治性疾患に対する治療オプションとしても有望ということが示唆された。Apigenin は多様な生理機能を有していることから、著者は、上記 NP 製剤を炎症性疾患および癌への適応へのアプローチも可能であるとの考察に至った。

## 審 査 の 要 旨

喫煙や食生活、抗生物質の不適切な使用などの環境因子が惹起する疾病の 1 つである IBD は、難治性疾患であり、患者数は世界で数百万人いるとされる。本研究では、天然物由来の薬効成分の薬理作用増強に向けた取り組みとして、薬物送達システムとその製剤の炎症部位への到達メカニズムの検討、大腸炎モデルマウスを用いた蛍光標識リポソーム集積による抗炎症作用、天然物由来抗炎症成分 Apigenin のリポソーム製剤化と抗炎症効果の検証に取り組み、複数のエビデンスを得ることに成功しており、高く評価される。将来的な製剤改良の点では、DDS 製剤は表面に抗体やペプチドを結合できること、また物性が似た複数の化合物を内封できる可能性もあることから、更に選択的に IBD や他の炎症性疾患の病変部位に Apigenin を到達できる可能性がある。環境因子が深く関与する炎症性疾患を対象とした以上の知見から、本製剤と天然物を組み合わせることで、新しい治療の機会を IBD 患者、ひいては多様な炎症性疾患の患者に供与できる可能性が示唆され、大きな波及効果が期待された。

令和元年 7 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（環境学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。