

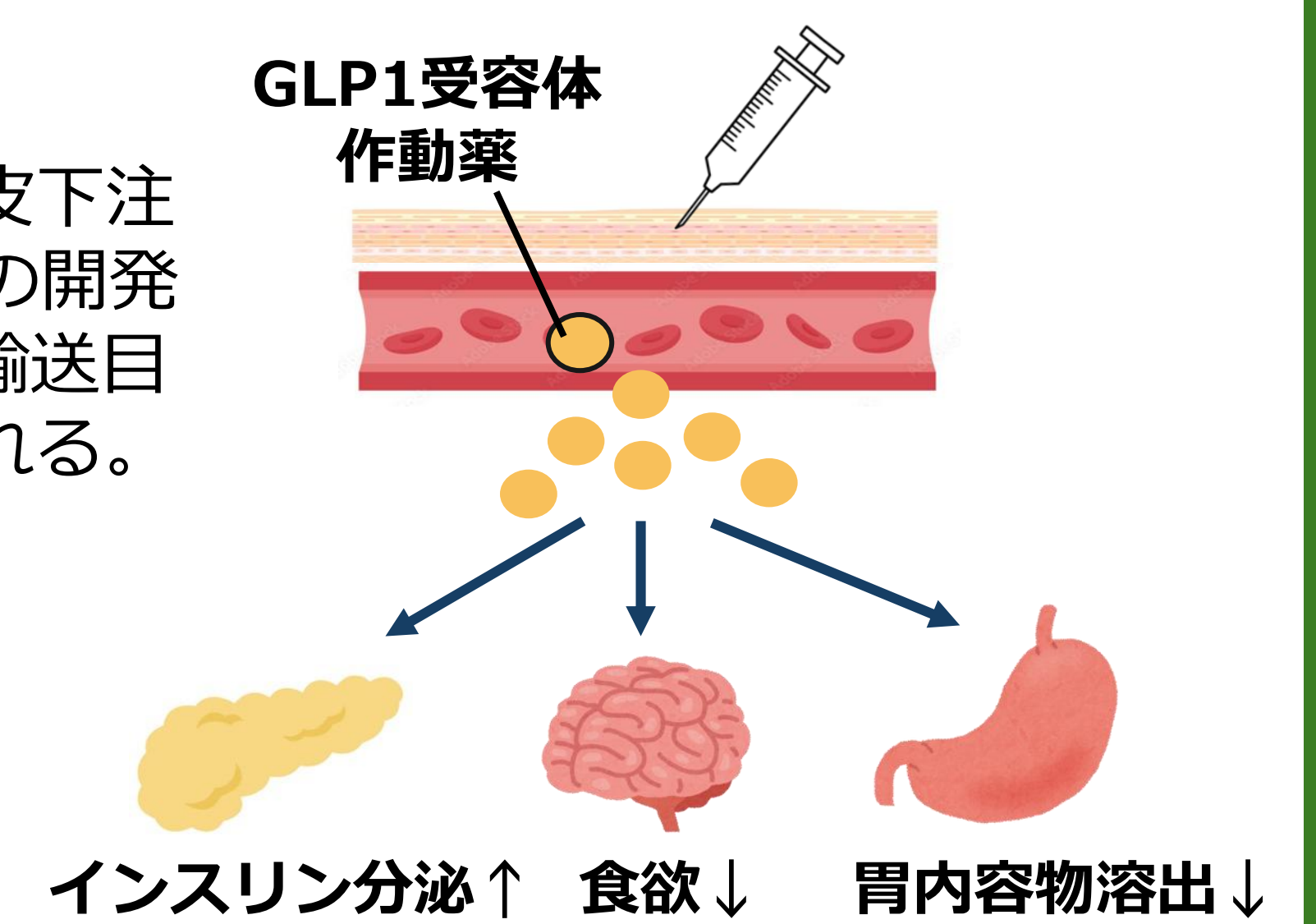
Abstract

世界的に糖尿病患者は増加しており、治療薬としてGLP-1受容体作動薬の重要性が高まっている。現在主流の皮下注射製剤は、痛みや手技の煩雑さによるアドヒアランス低下が課題であり、患者負担を軽減できる新たな投与形態の開発が求められている。Lipid nanoparticle (LNP) は薬物担体として注目されており、近年では抗体やペプチドの輸送目的で実用化が進んでいる。一方で、LNPには免疫原性の問題や注射剤としての使用に限定されることが課題とされる。

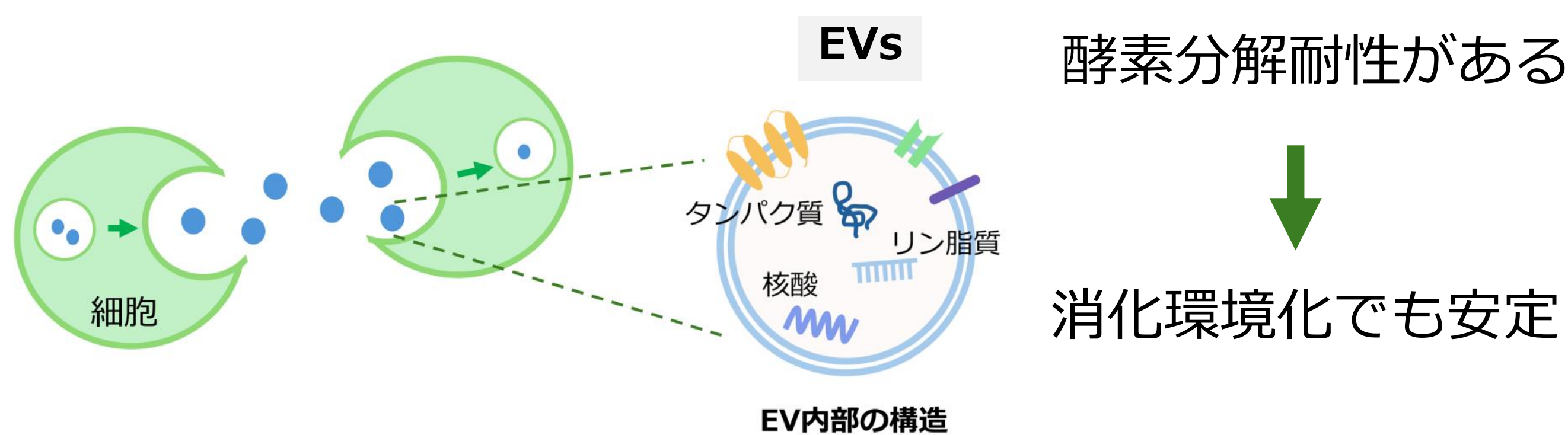
本研究ではペプチド薬の経口剤化を目指し、GLP-1製剤が細胞外小胞(EVs)と結合しやすい構造を有していることを利用し、免疫原性の低いミルク由来EVsと複合体を形成し活性を有するかを以下の手順で検討した。

- (1) 蛍光EVs追跡システム、(2) 最適蛍光基-ペプチドの探索、(3) GLP-1-GLP-1R(受容体)活性検証、(4) 胃吸収・体内動態評価系

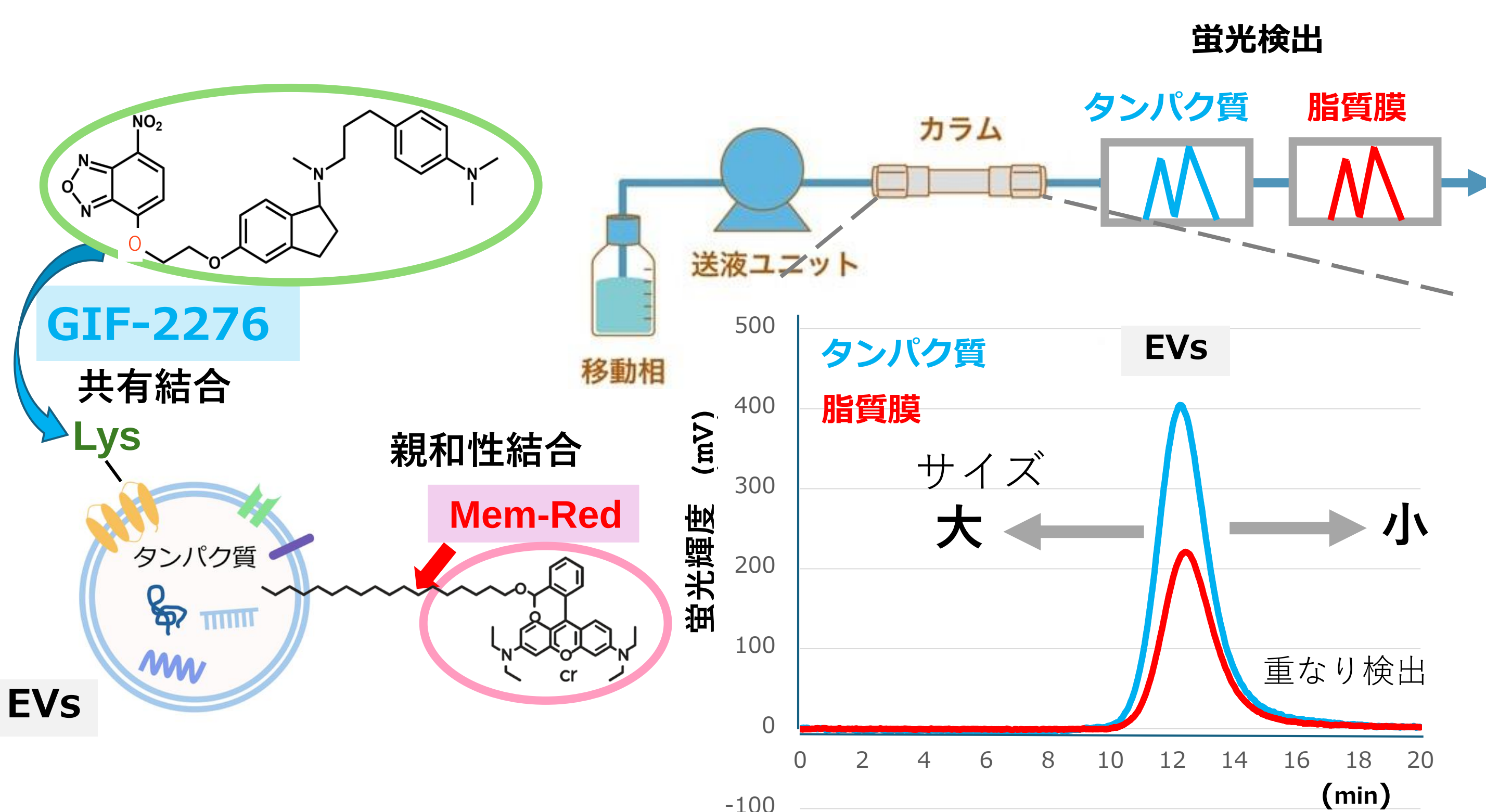
結果、GLP-1製剤がEVsと複合体を形成した後も活性を有することが示唆された。



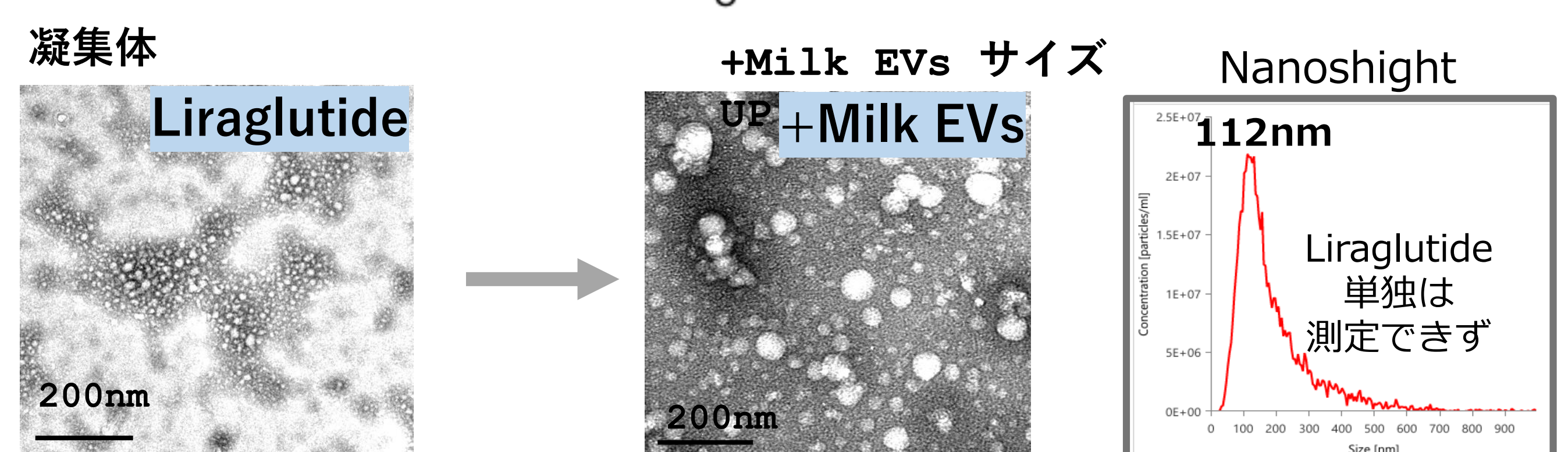
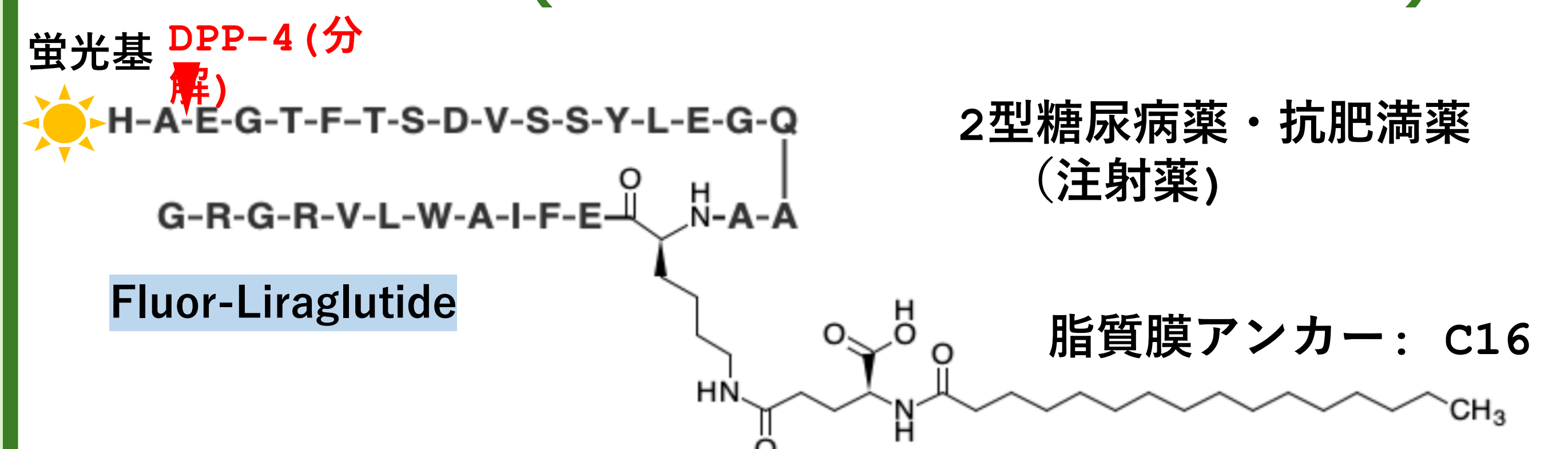
細胞外小胞(EVs)とは



HPLC-SEC(サイズ排除クロマト)分離

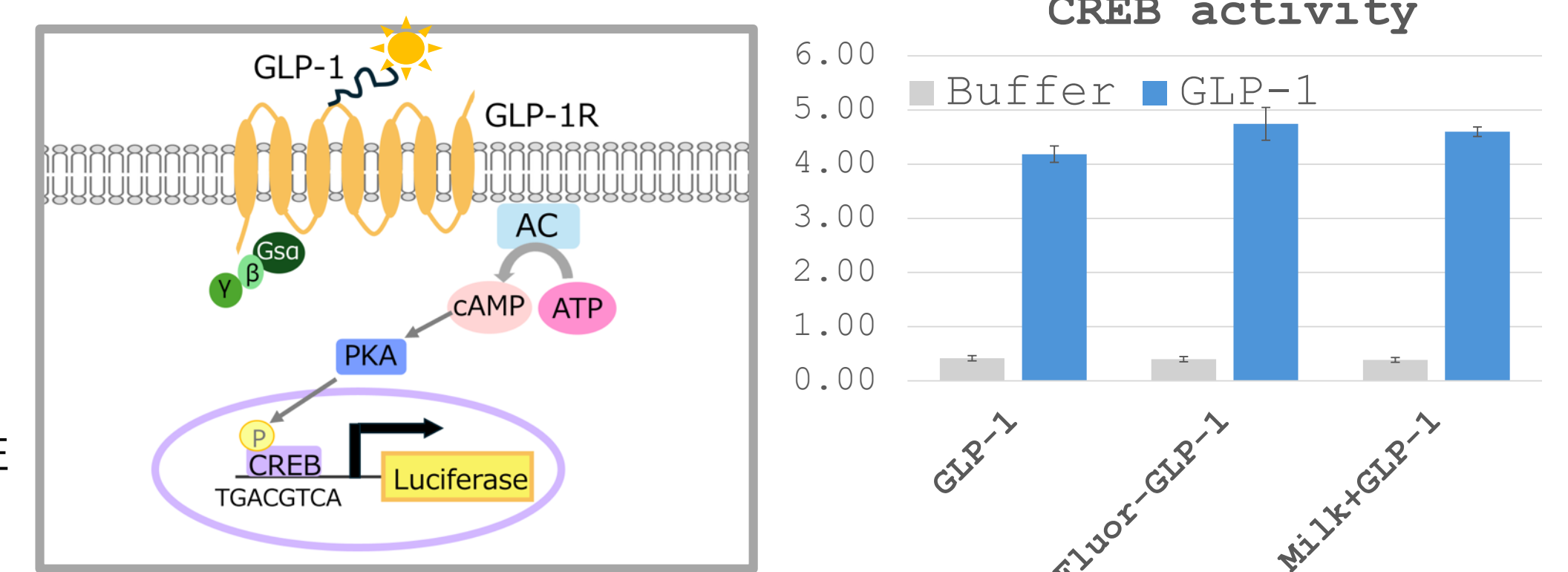


蛍光化ペプチド (候補 : GLP-1Rアゴニスト製剤)

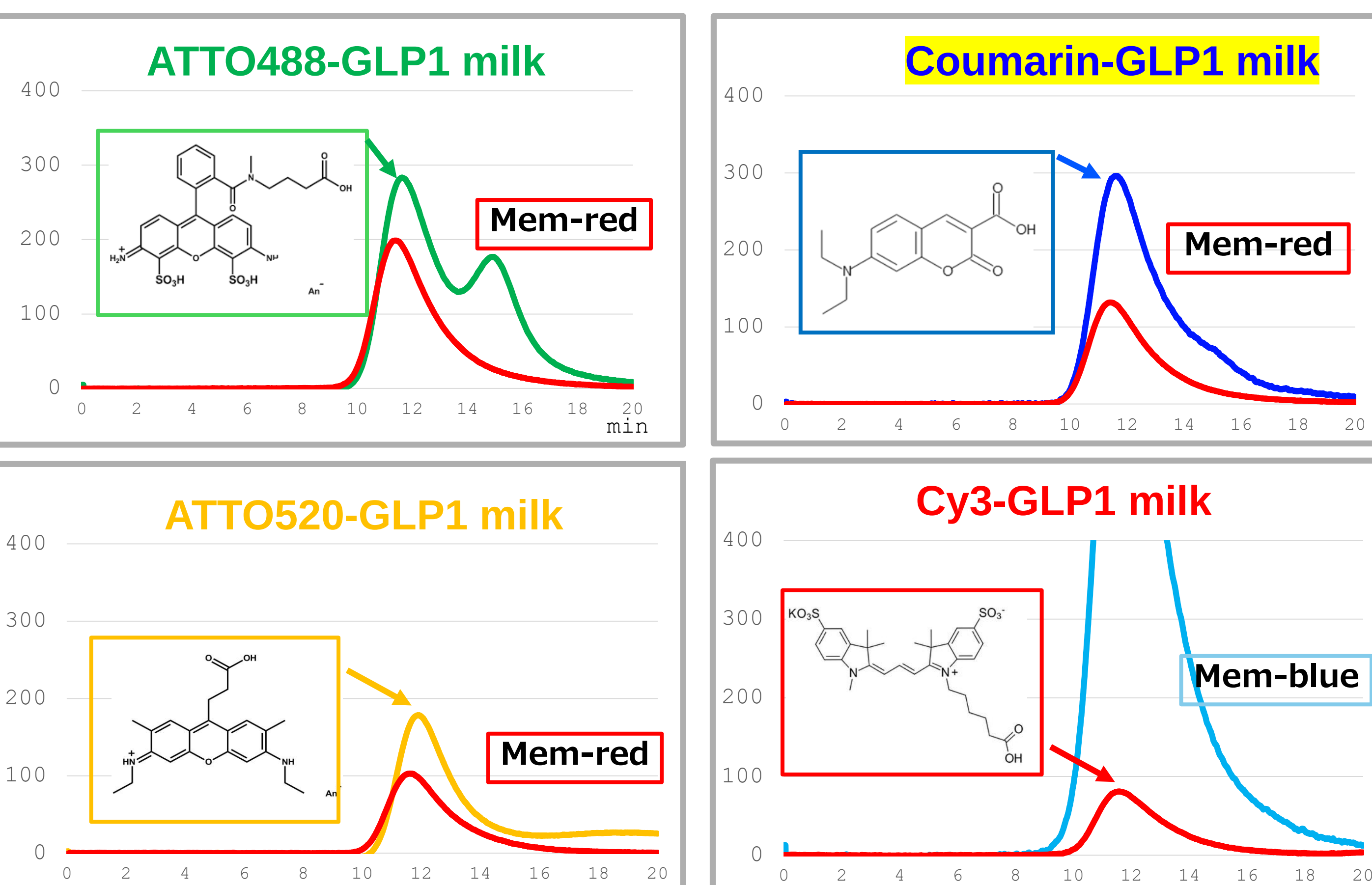


GLP-1活性評価システム

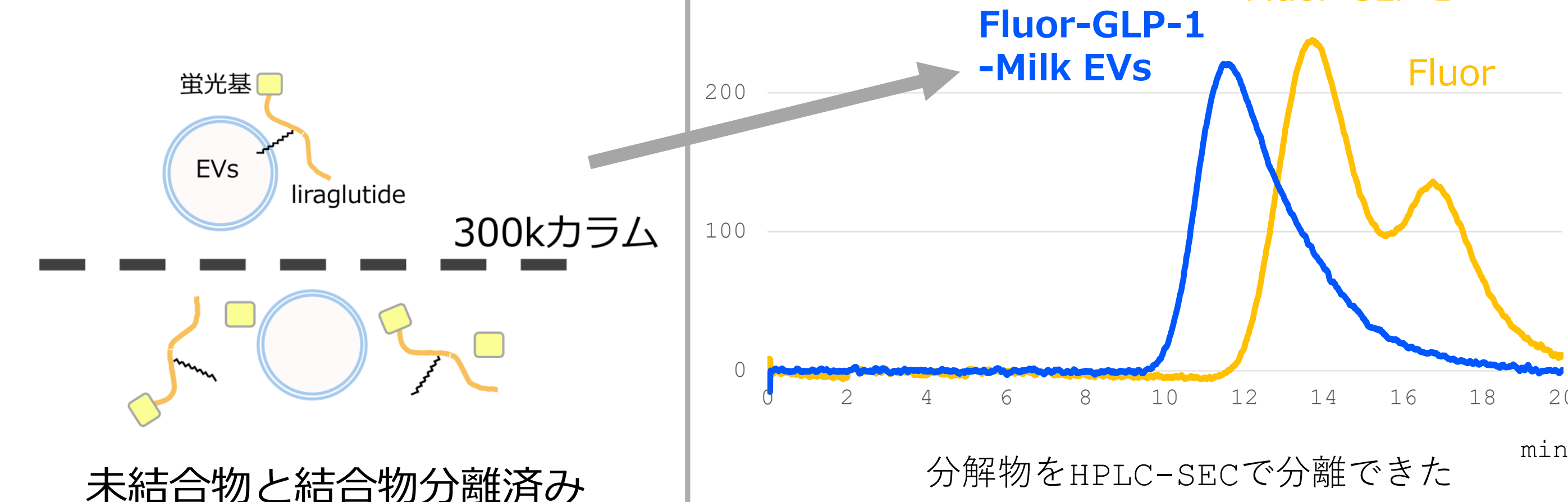
Fluor-Liraglutideも活性を有している



蛍光基の選別

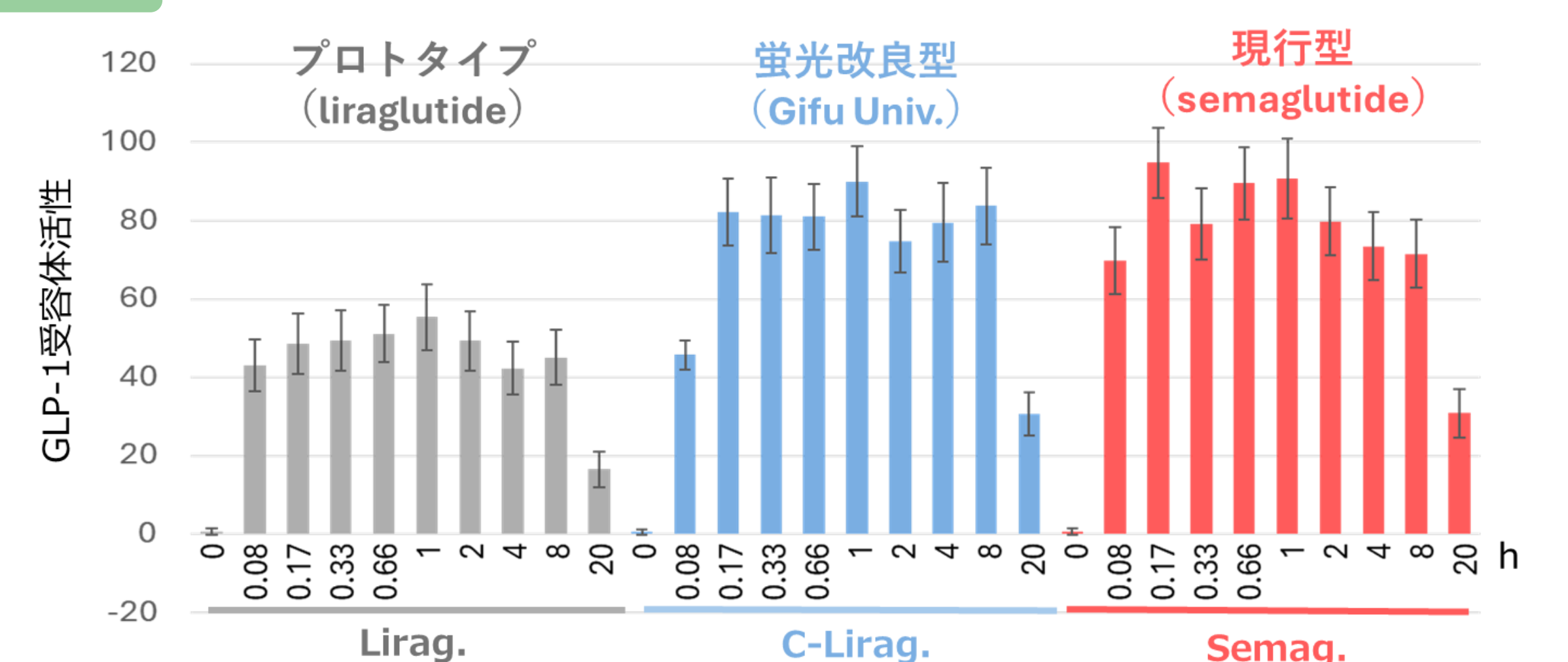


Milk EVs複合体の分離

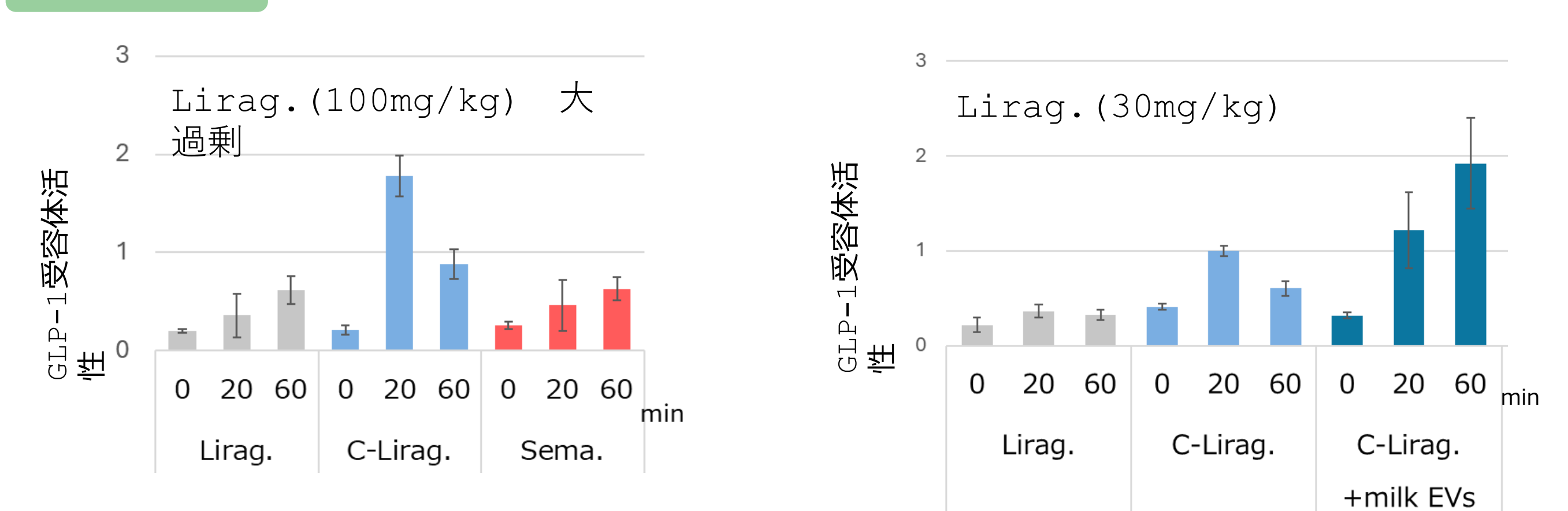


胃吸収・体内動態評価系

皮下注射



経口投与



conclusion

本研究により、liraglutide がミルク由来EVsと安定的に結合することを確認し、その評価に適したラベル剤を特定できた。

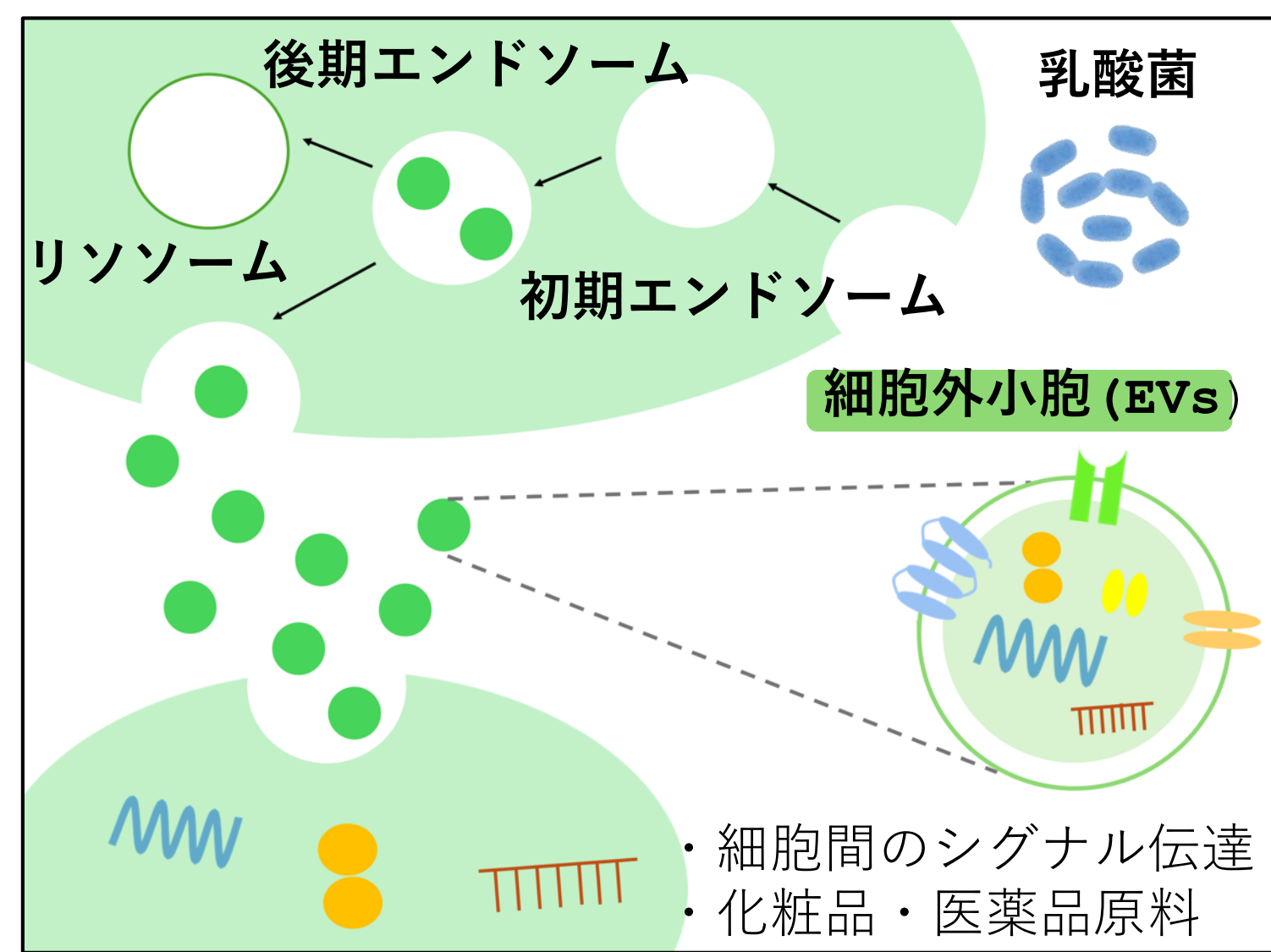
さらに、胃吸収・体内動態評価により liraglutide coumarin はEVsと結合することで胃吸収促進する可能性が示された。今後、GLP-1受容体作動薬の1つであるsemaglutideの構造を改変し、EVsとの結合効率の向上と、構造の安定化を図る。

Abstract

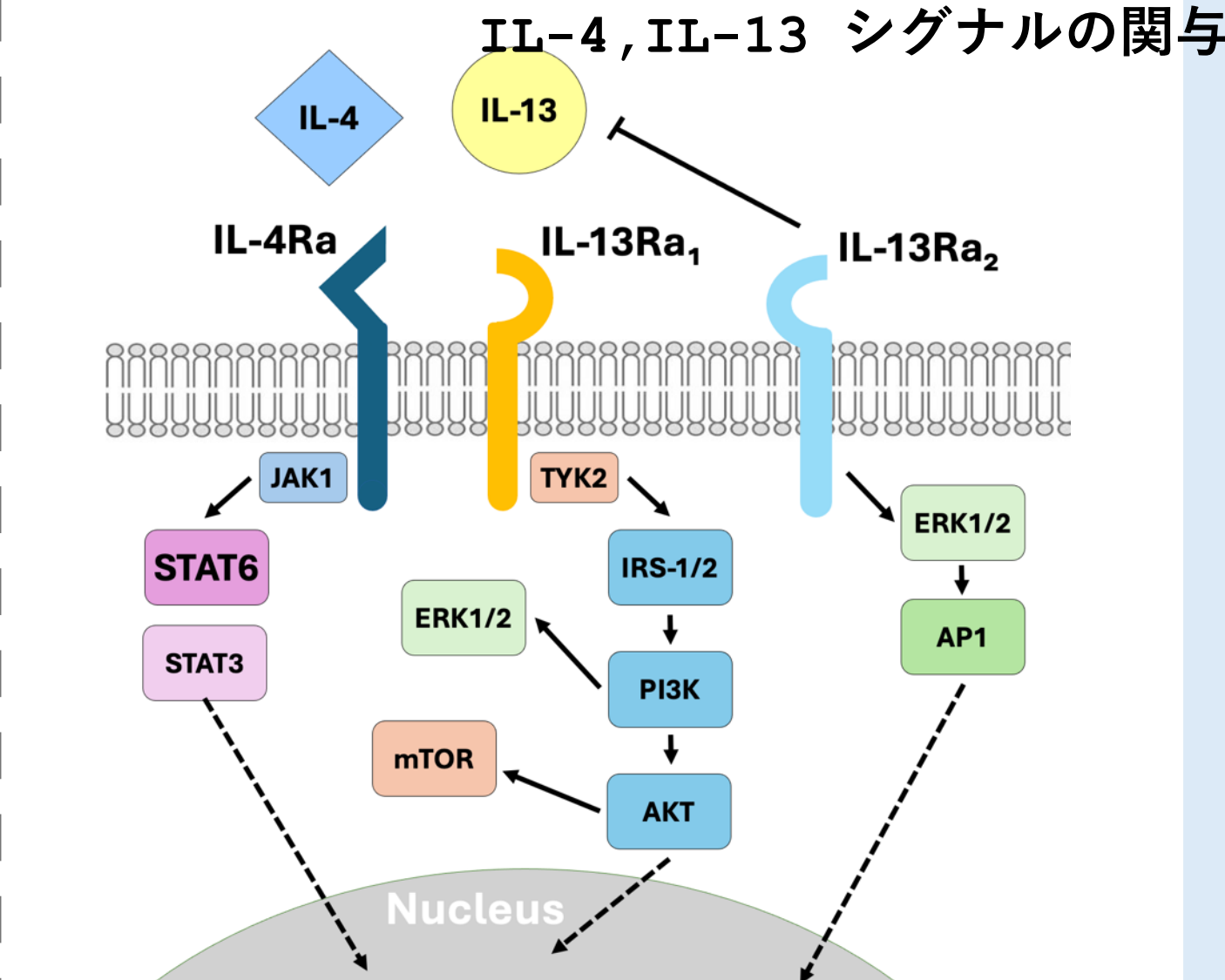
近年、細胞外小胞（EVs）は哺乳類に限らず、植物・微生物由来においても医薬・化粧品分野で注目されている。乳酸菌もEVs様小胞を分泌し、宿主応答や菌叢維持への関与が示唆されている。本研究では、植物由来乳酸菌が分泌するEVsの免疫調節作用に着目した。乳製品や発酵食品から単離された乳酸菌は免疫増強作用を有することが知られているが、その作用機序は十分に解明されていない。そこで、アトピー性皮膚炎に関与するIL-13/STAT6経路を標的とし、STAT6応答性レポーターアッセイを確立した。さらに*Lactiplantibacillus plantarum*を用いてEVs様小胞を単離するため、MRS液体培地および植物原料含有培地で培養後、遠心および段階的ろ過により精製し、HPLC-SECにより純度を確認した。得られたEVsは免疫応答レポーターアッセイおよびWestern Blottingにより評価した。その結果、植物由来乳酸菌EVsは一貫して免疫抑制傾向を示し、この活性はEVs画分に顕著に濃縮されていた。また、水酸化脂肪酸のスクリーニングにより一部で免疫抑制作用が示唆され、Western BlottingではSTAT6のリン酸化低下が確認された。

Background

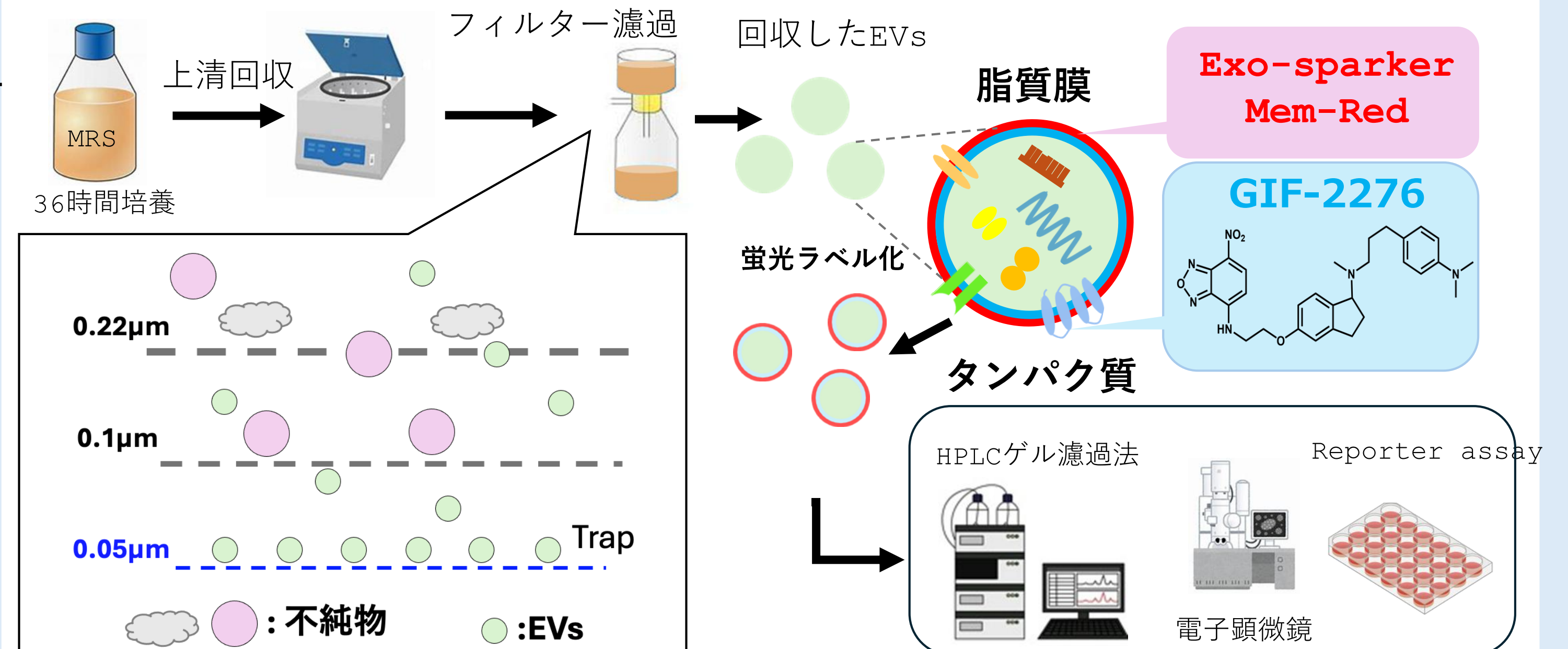
● 細胞外小胞 (EVs) とは



● アトピー性皮膚炎 (AD) のシグナルの関与

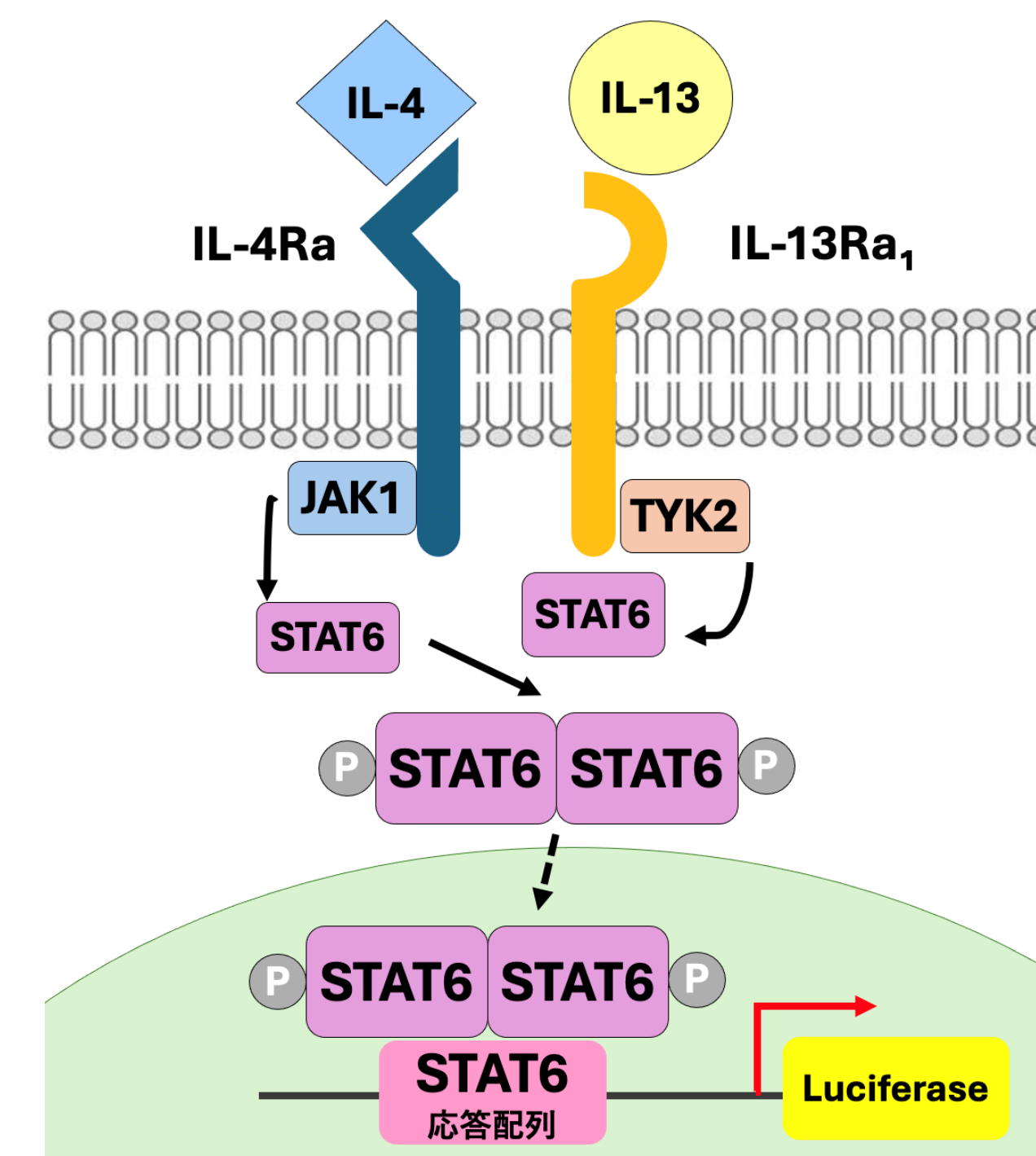


Methods

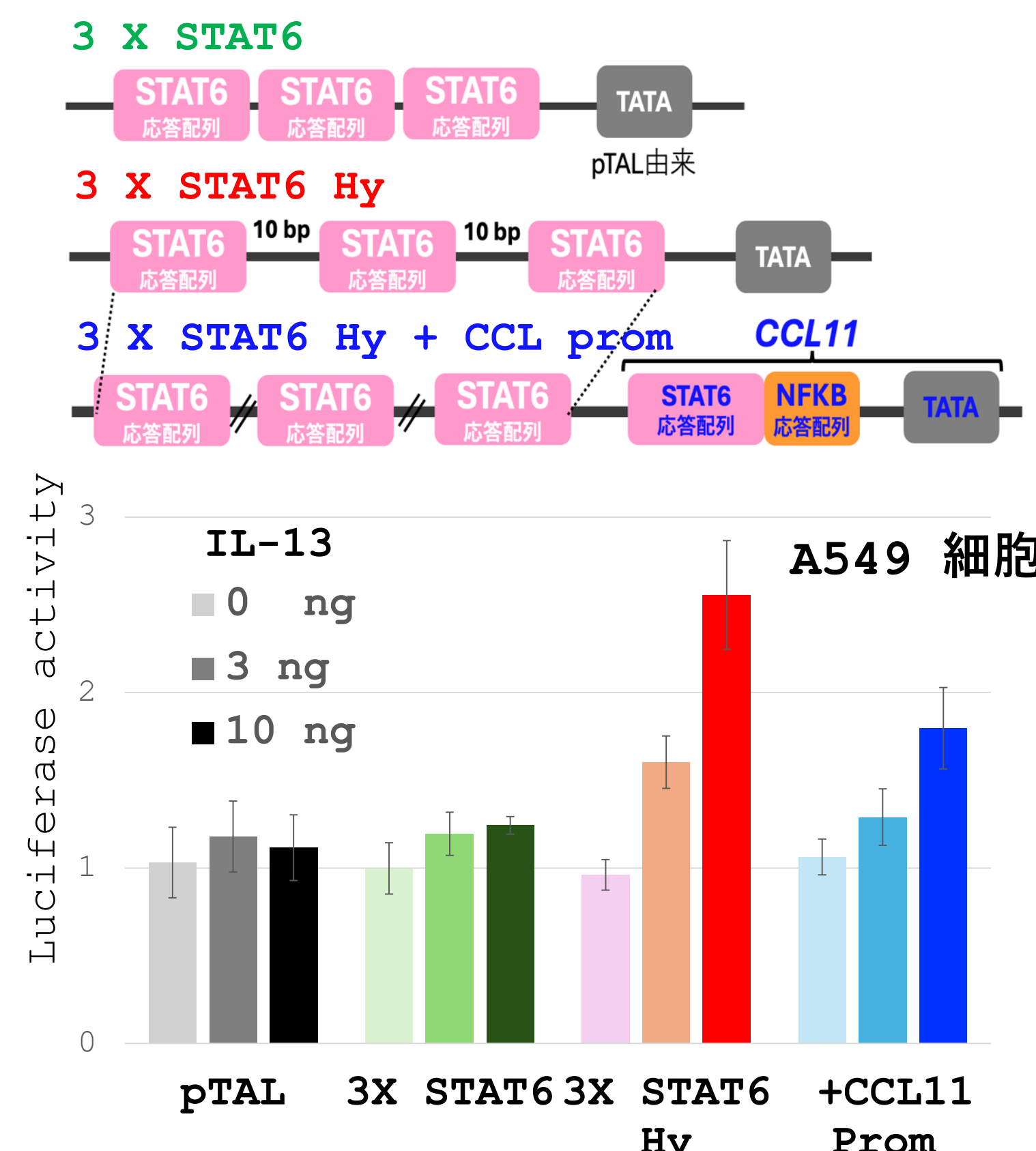


Results | レポーター配列の最適化

Reporter assay

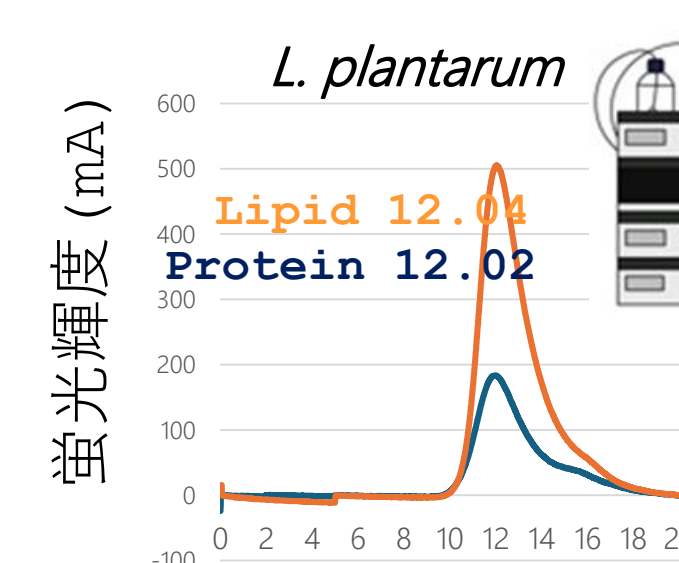


レポーター配列は、3XSTAT6 Hyを選択し、STAT6の強制発現を行うこととした

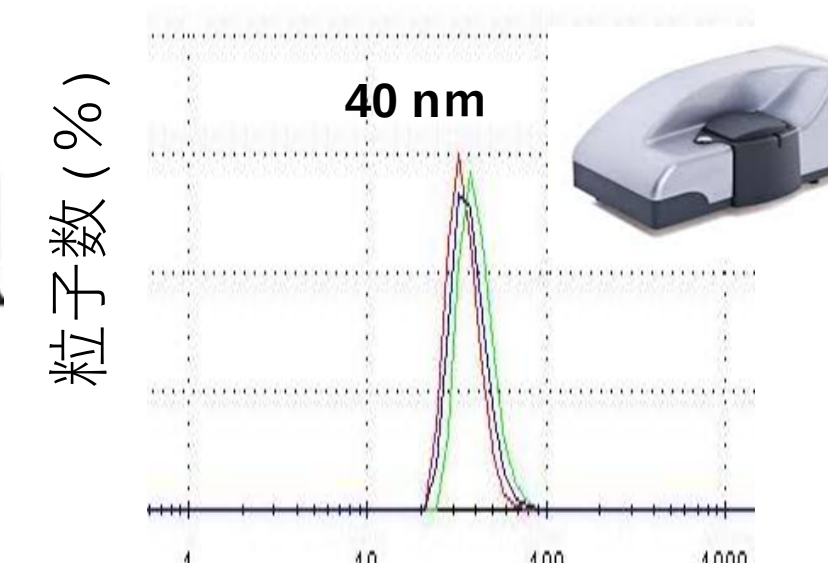


Results | 乳酸菌EVsによる活性抑制

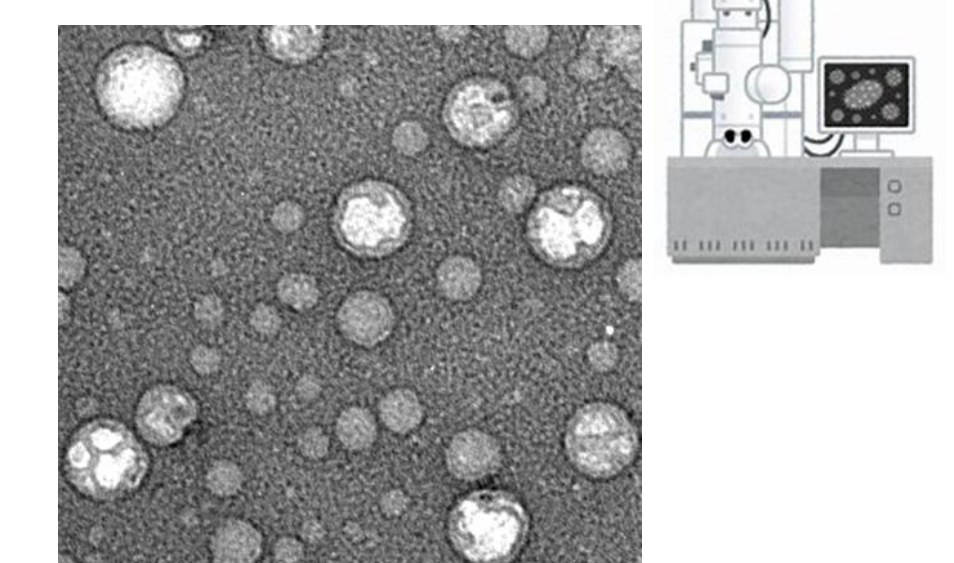
HPLCゲル濾過法



Zeta Nano (DSL)

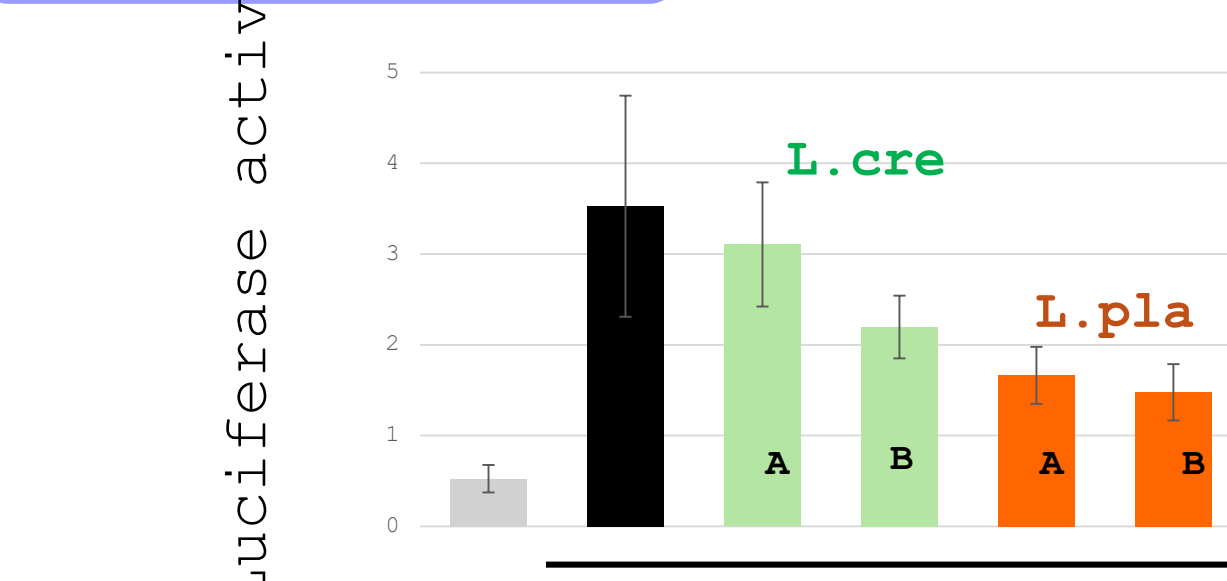


電子顕微鏡



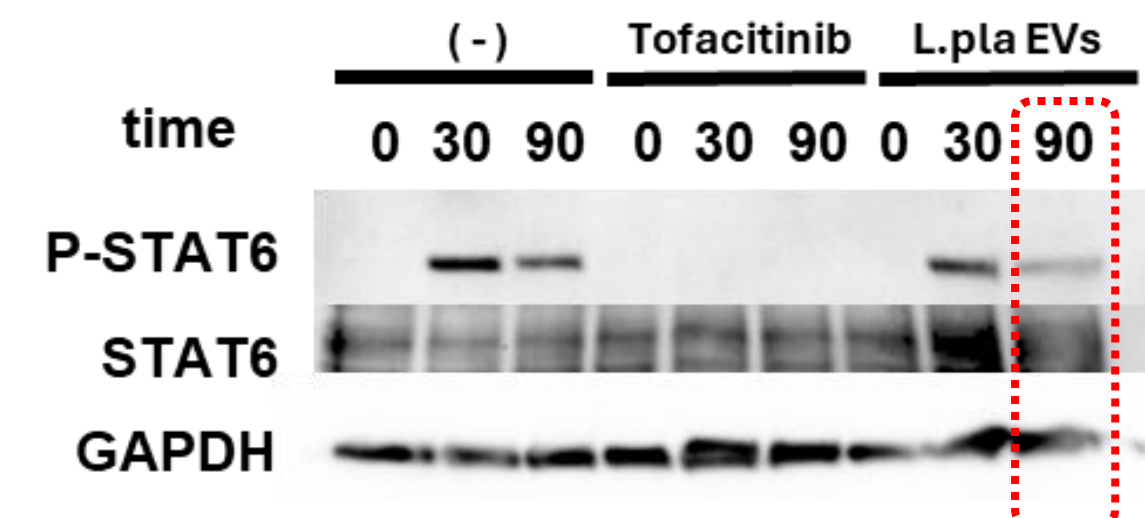
L. Plantarum由来EVsの精製が確認

Reporter assay



Western blot

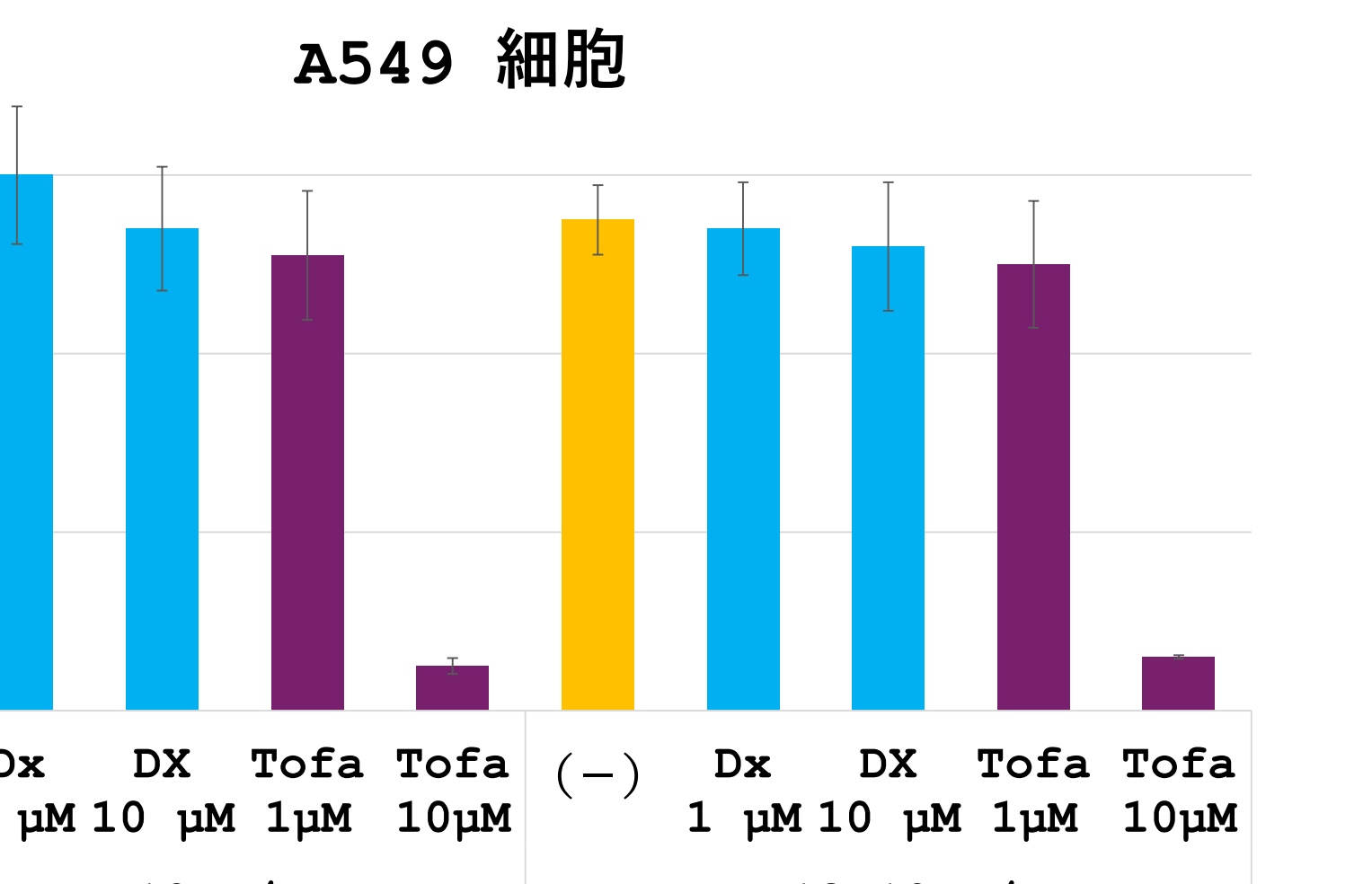
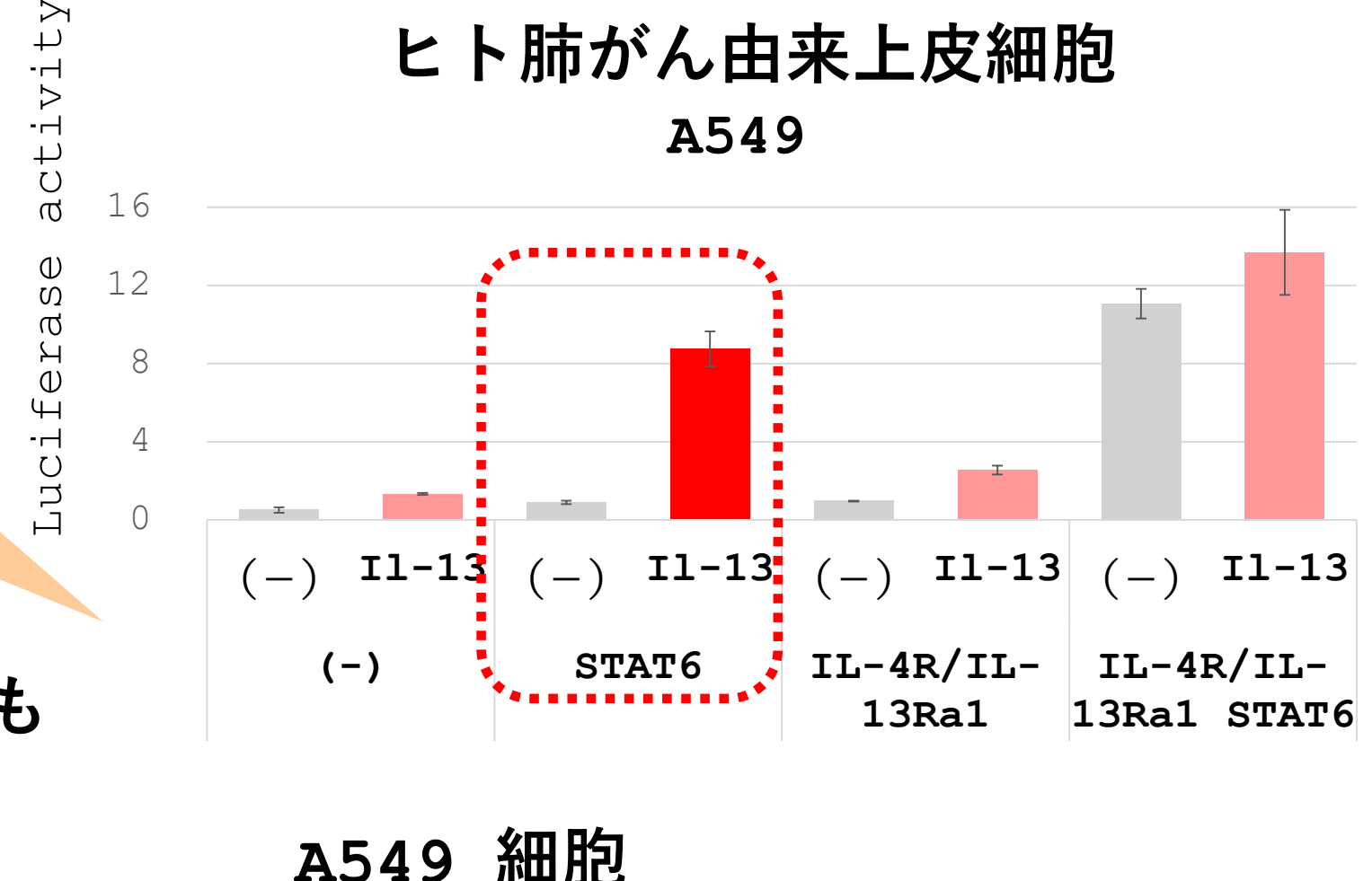
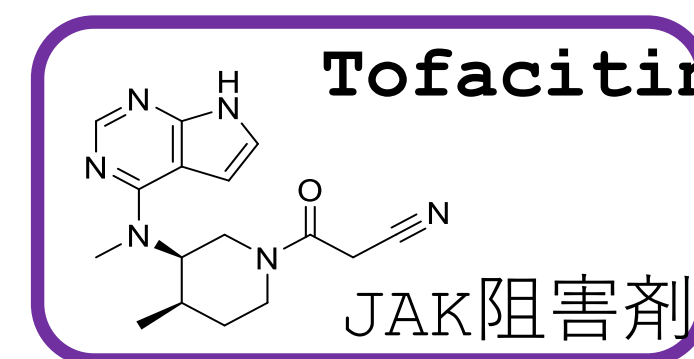
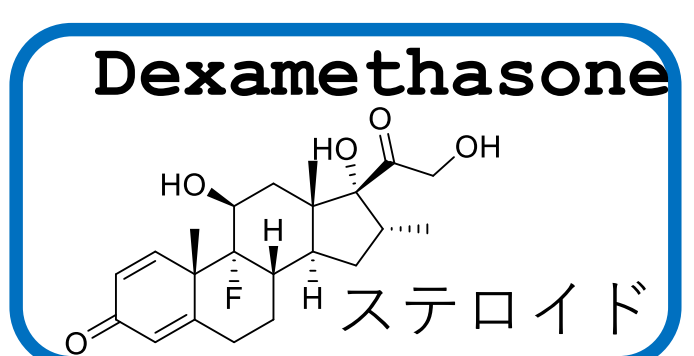
免疫調節効果は菌体画分よりもEVs画分に強く濃縮



Results | 細胞の最適化/妥当性確認

Reporter assay

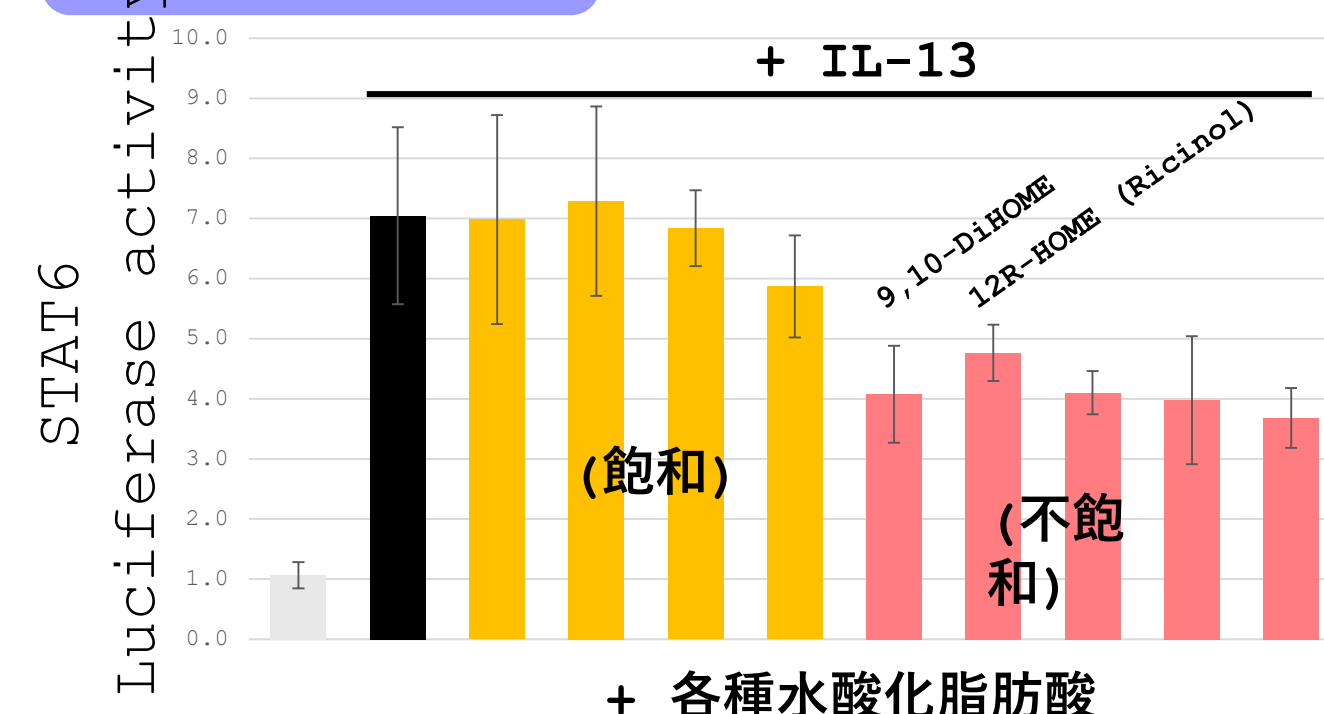
A549ではIL-4R/IL-13Ra1の強制発現無しでも安定 (誤差が小さい)



ステロイドでSTAT6活性は抑制されないが、JAK阻害剤で抑制 → STAT6活性評価が可能

Results | 脂肪酸添加による活性抑制

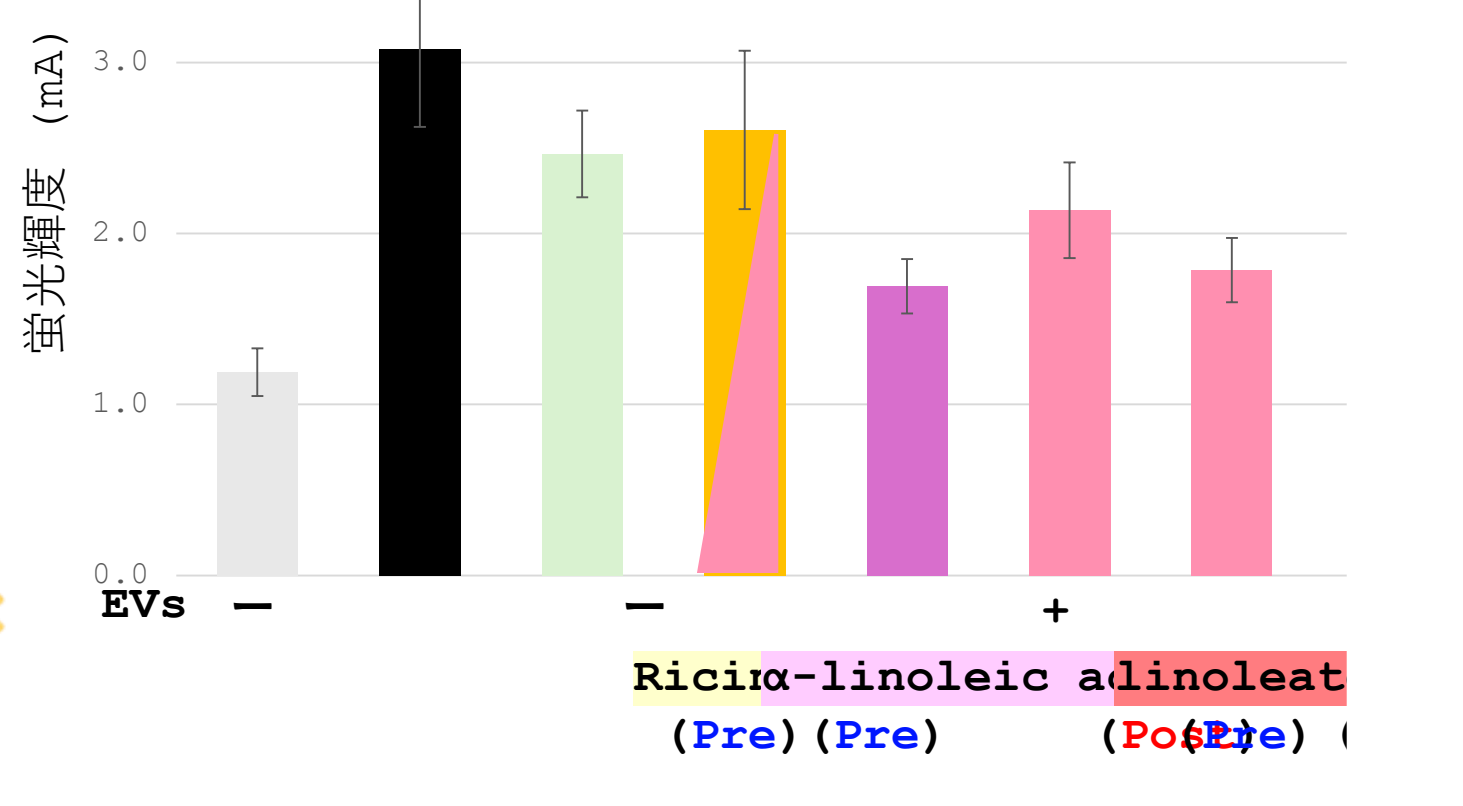
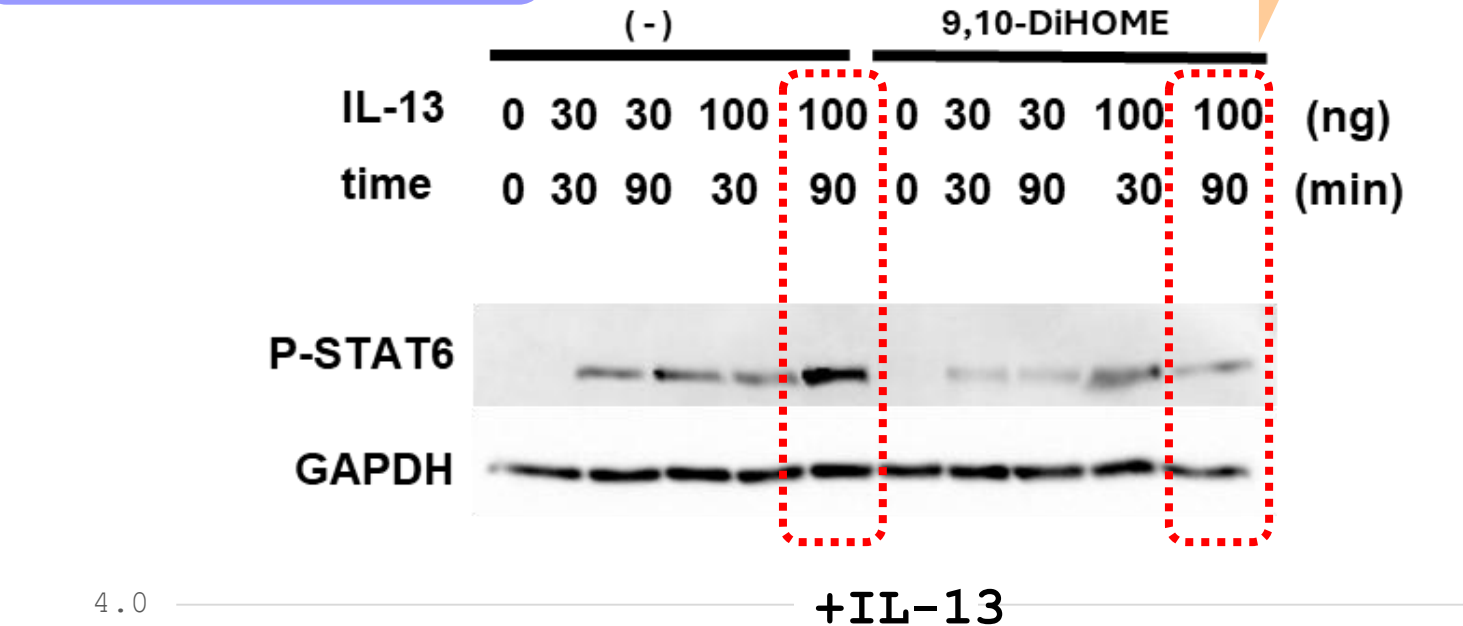
Reporter assay



不飽和水酸化脂肪酸がPSTAT6を抑制



Western blot



MRS培地への脂肪酸添加でEVsの効果が増強した

Conclusion

STAT6応答性レポーターアッセイとWestern Blottingでは、一部の植物性乳酸菌由来EVs様小胞は一貫して免疫抑制の傾向になることが示唆された。今後はEVs内の活性脂質の同定と作用機序の解明を進め、炎症性疾患への応用を目指す。