

乳酸菌表層タンパク質結合によるリポソーム の安定化と特異的デリバリー

東京工業大学 生命理工学院
ライフエンジニアリングコース
教授 山本 直之

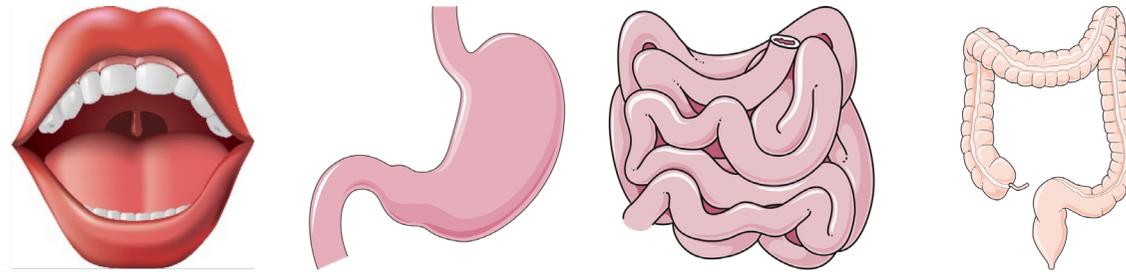
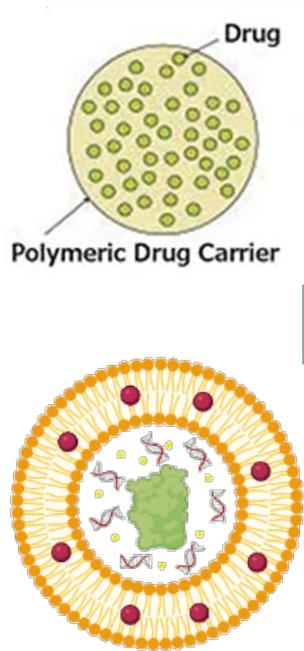
2023年11月28日

従来技術とその問題点

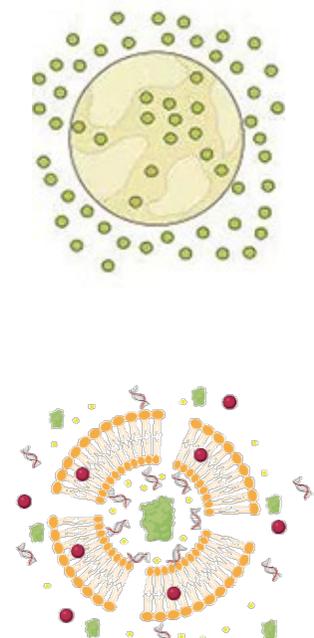
既に実用化されているリポソームは経口投与においては、
消化液に対して不安定であること
特異的デリバリーが難しい

等の問題があり、広く利用されるまでには至っていない。

経口投与リポソームの問題点



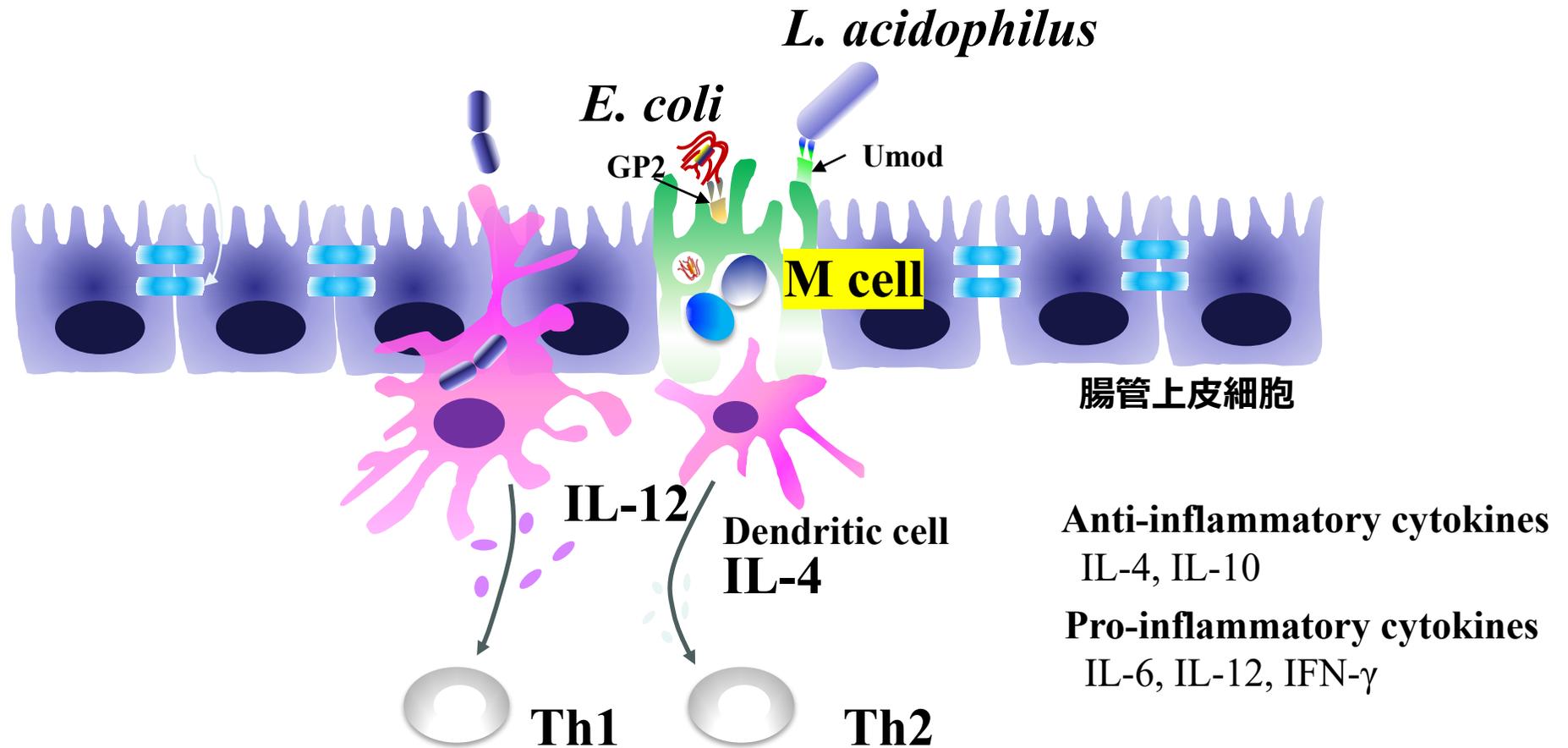
Properties			
<p>Mouth pH 5 - 7 5 - 60 s</p> <ul style="list-style-type: none"> • Salts • Enzymes 	<p>Stomach pH 1 - 3 0.5 - 4 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • Salts • Enzymes • Agitation 	<p>Intestine pH 6 - 7.5 1 - 2 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • Salts • Enzymes • Agitation 	<p>Colon pH 5 - 9 12 - 24 h</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacteria • Enzymes • Agitation
Challenges			
<ul style="list-style-type: none"> • Taste 	<ul style="list-style-type: none"> • Gastric degradation 	<ul style="list-style-type: none"> • Poor aqueous solubility • Lipid emulsification • Mucosal barrier • Short residence time 	<ul style="list-style-type: none"> • Poor aqueous solubility • Mucosal barrier • Bacteria



消化酵素での不安定化と腸管特異性

新技術の着想

プロバイオティクスの腸管への作用

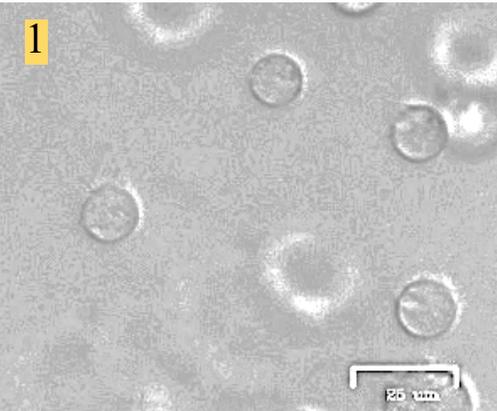


特異分子のレセプター結合が機能発現に重要

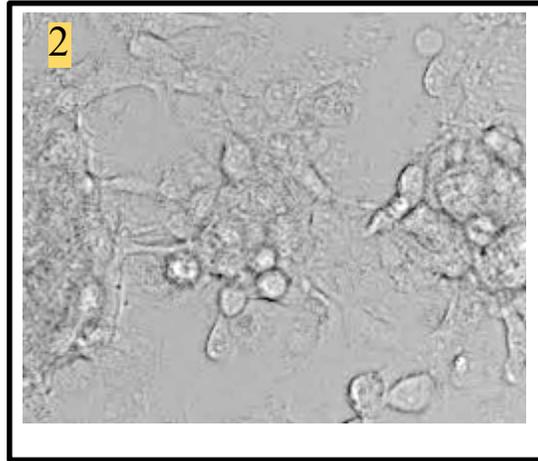
THP-1 細胞の樹状化 (DC-SIGN発現)

Monocytic THP-1 cells

Differentiated THP-1 DCs



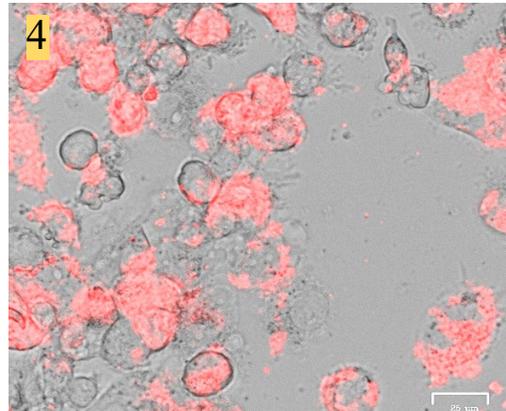
THP-1: 5×10^5 /ml



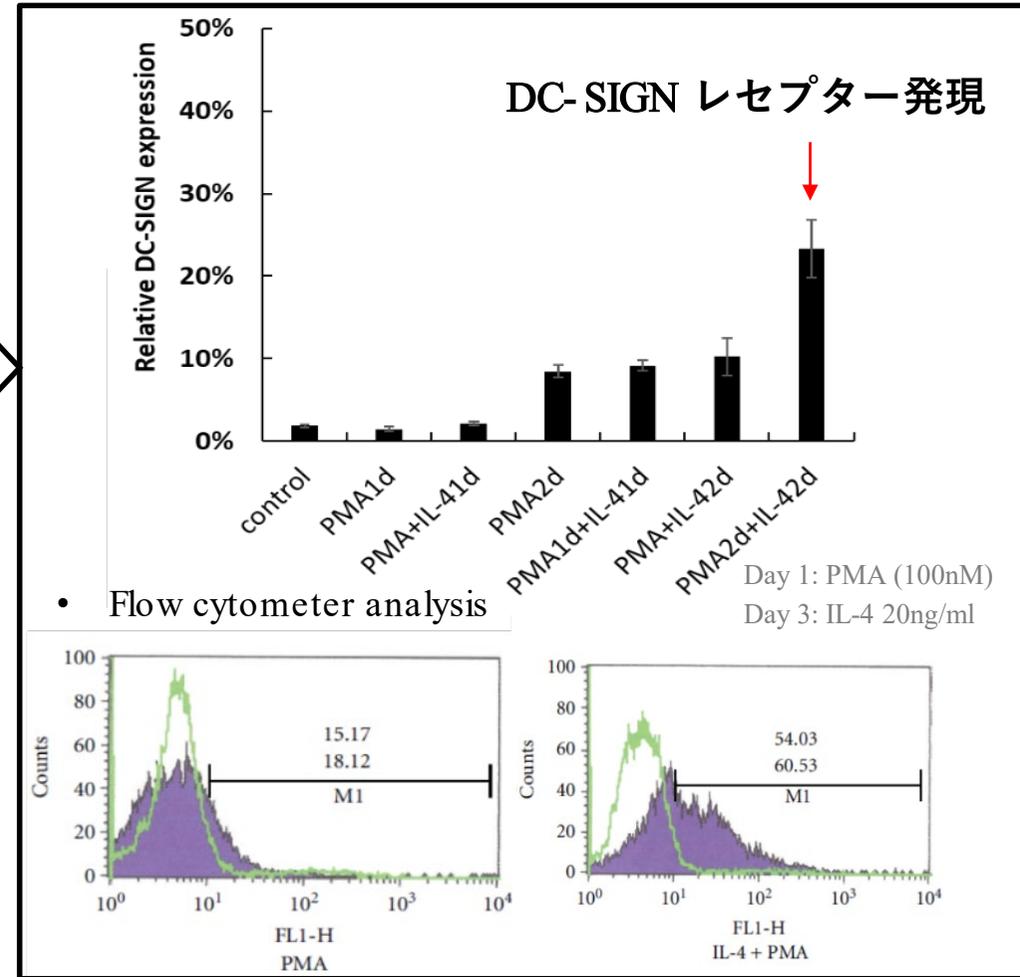
3



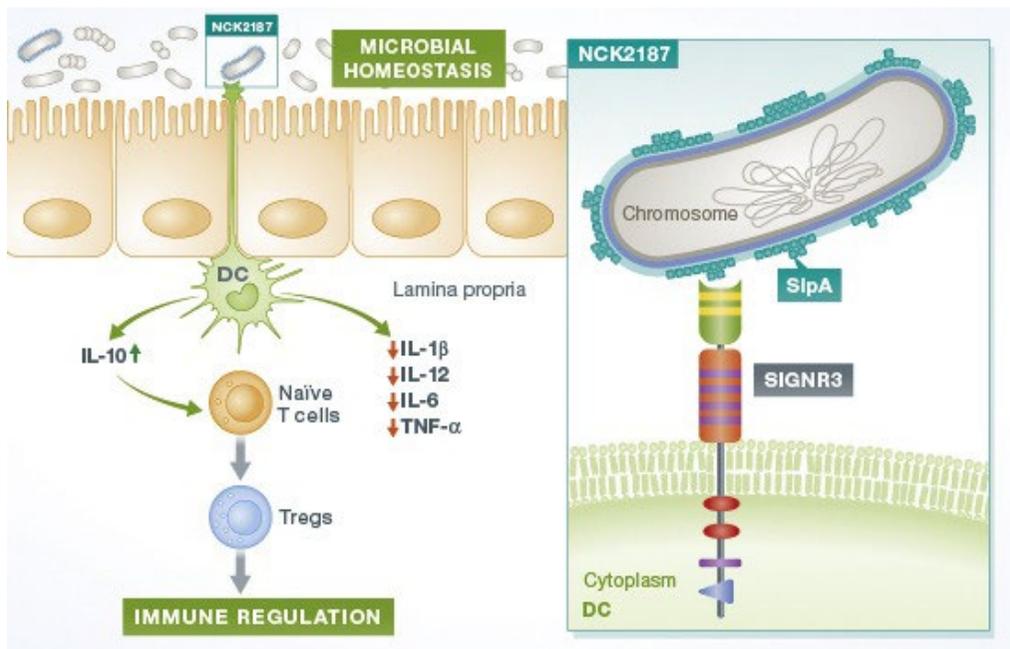
Uptake of Cy3 labeled
L. brevis JCM 1059
into THP-1 DC



Add 2.5×10^7 /ml bacteria



SlpA-SIGNR3 結合による 免疫細胞への取り込みと活性化



Lightfoot YL, Selle K, Yang T, et al. SIGNR3-dependent immune regulation by *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein A in colitis. *EMBO J.* 2015;34(7):881-895.

樹状細胞への取り込みにおける 表層蛋白質の重要性

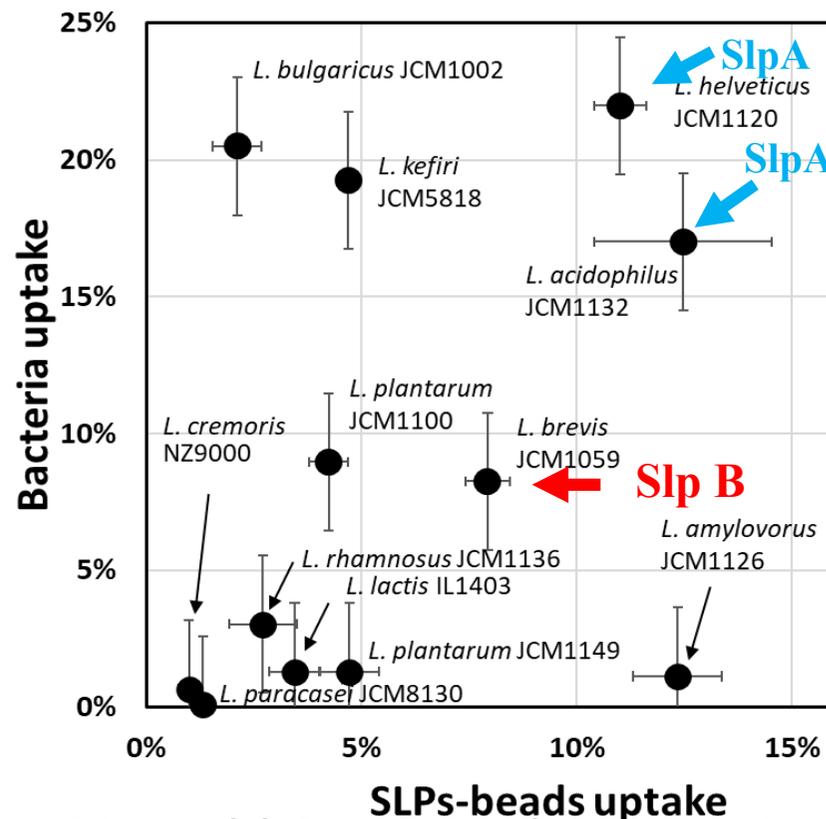
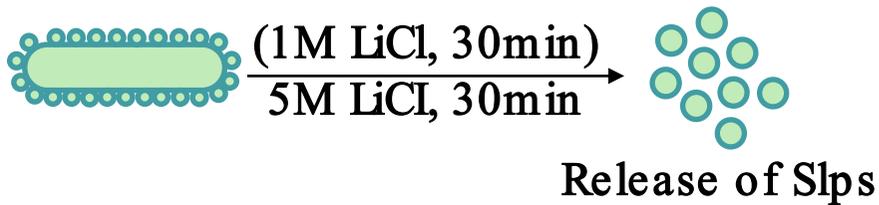


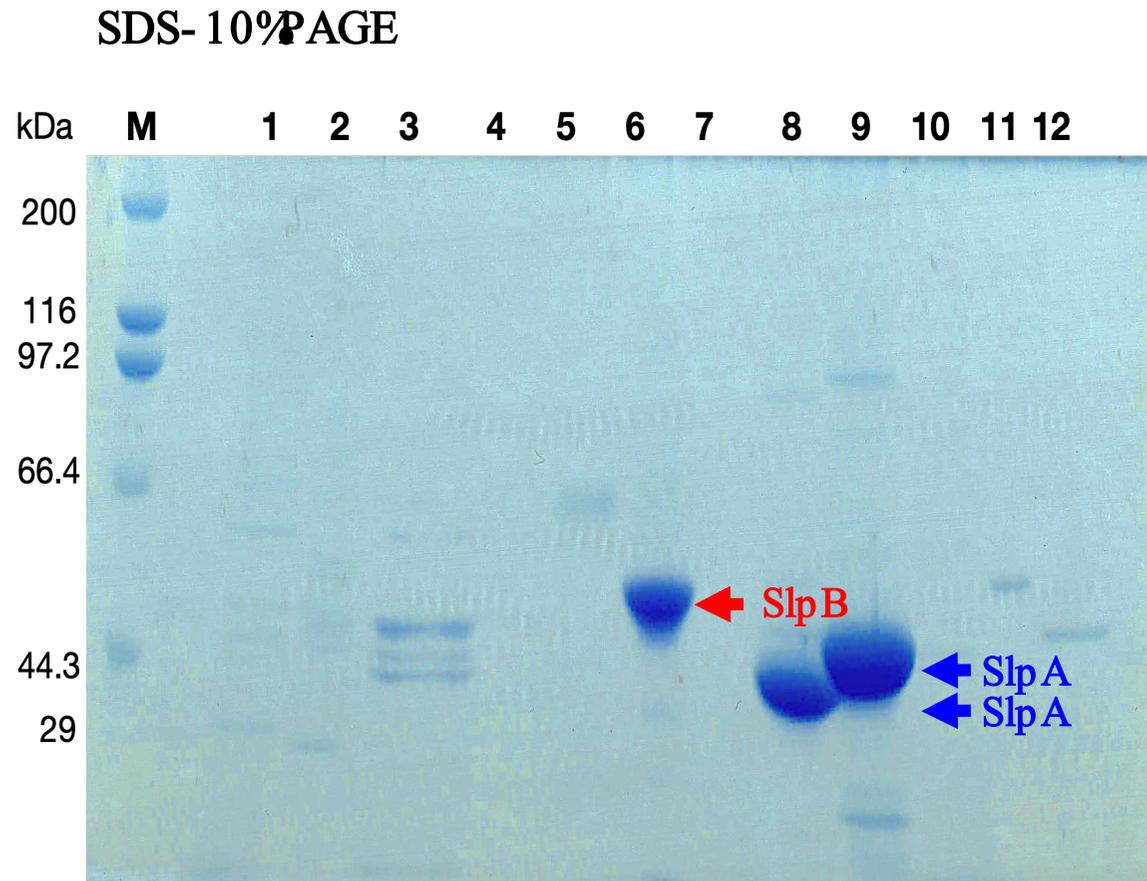
Fig. Uptakes of Cy3 labelled surface layer protein A ($Cy3$ SlpA) lactic acid bacteria (LAB) and **Slps-coupled microbeads** by THP-1 DCs.

各種乳酸菌の表層蛋白質

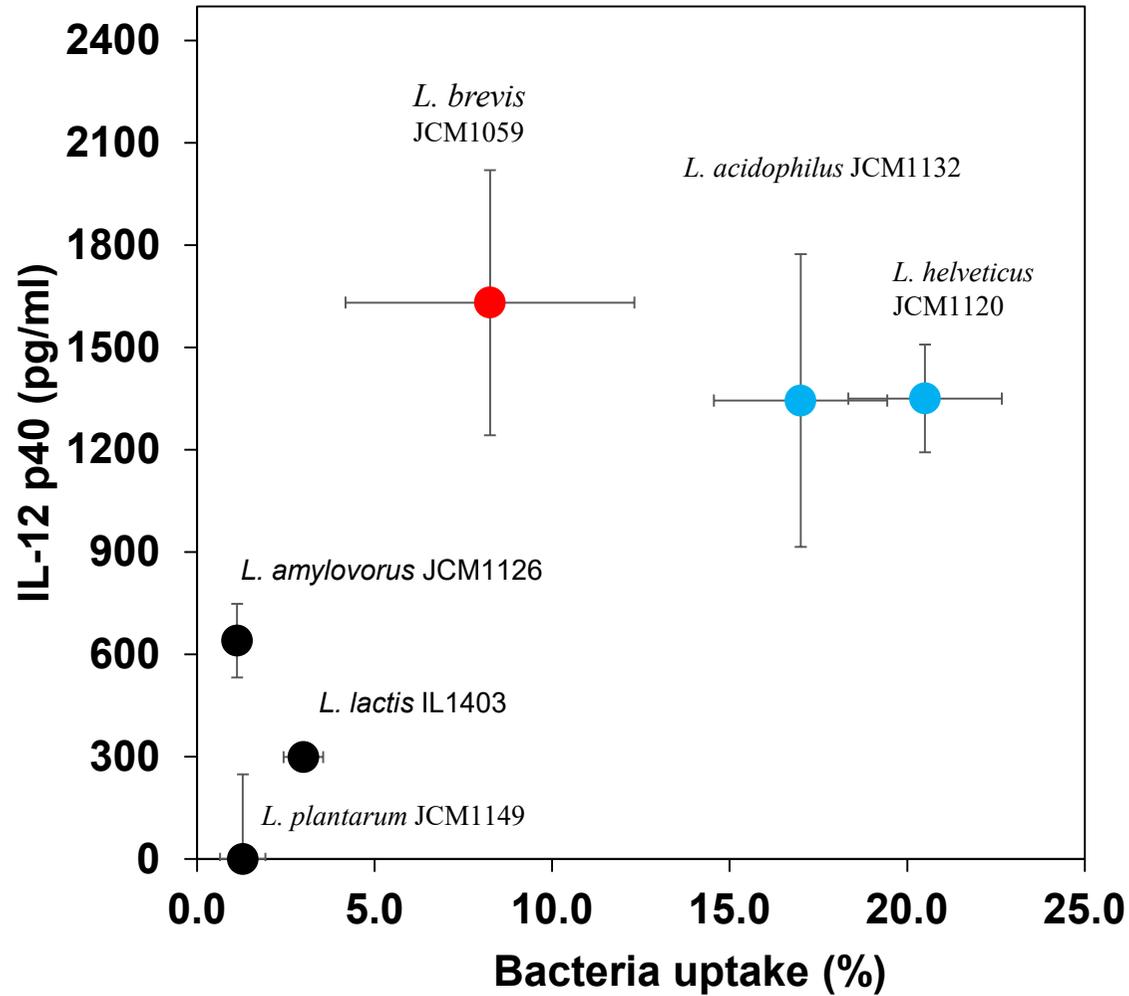


- lane 1: *L. plantarum* JCM 1149
- lane 2: *L. lactis* NZ 9000
- lane 3: *L. amylovorus* JCM 1126
- lane 4: *L. paracasei* JCM 8130
- lane 5: *L. kefir* JCM 5818
- lane 6: *L. brevis* JCM 1059

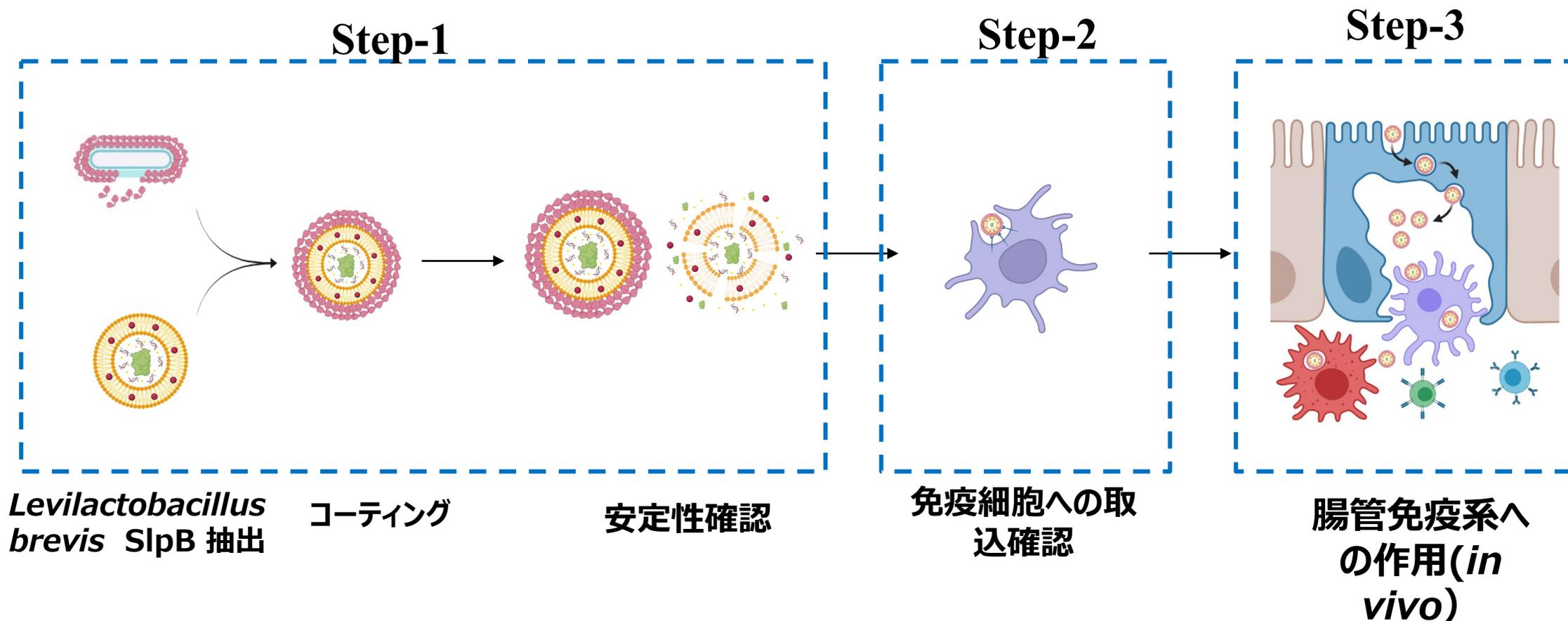
- lane 7: *L. plantarum* JCM 1100
- lane 8: *L. helveticus* JCM 1120
- lane 9: *L. acidophilus* JCM 1132
- lane 10: *L. plantarum* TIN-KL001
- lane 11: *L. lactis* IL1403
- lane 12: *L. rhamnosus* JCM 1136



サイトカイン産生と樹状細胞への取り込み



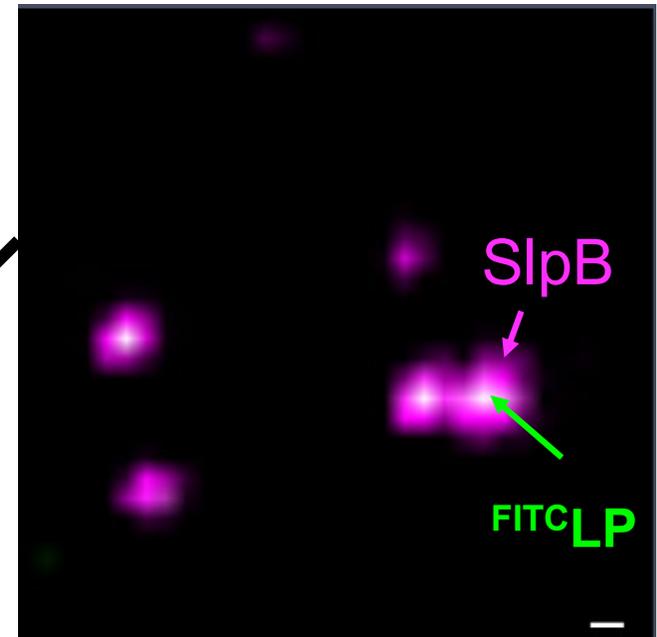
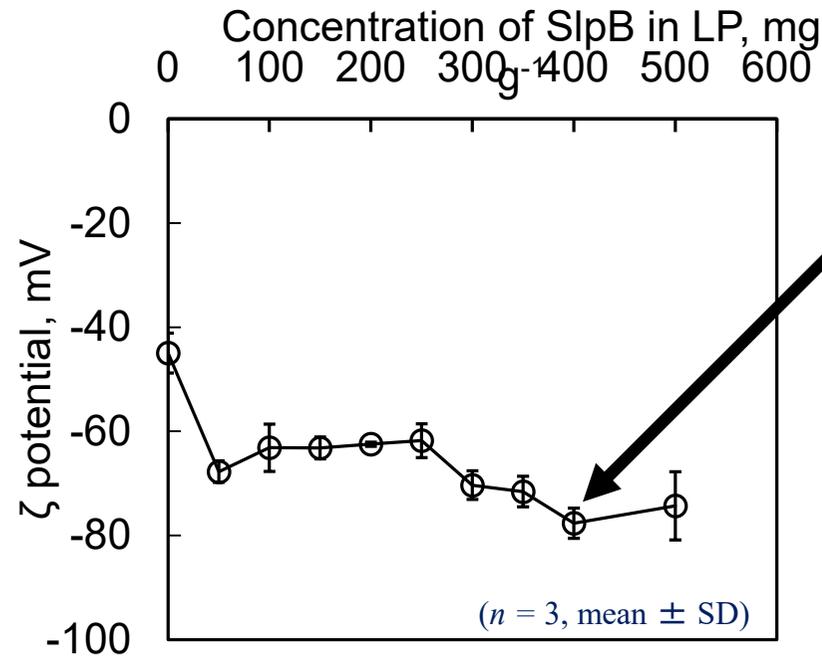
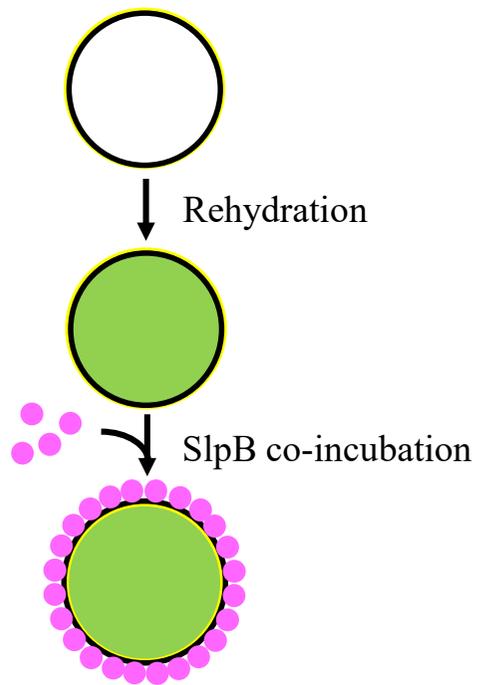
新技術開発



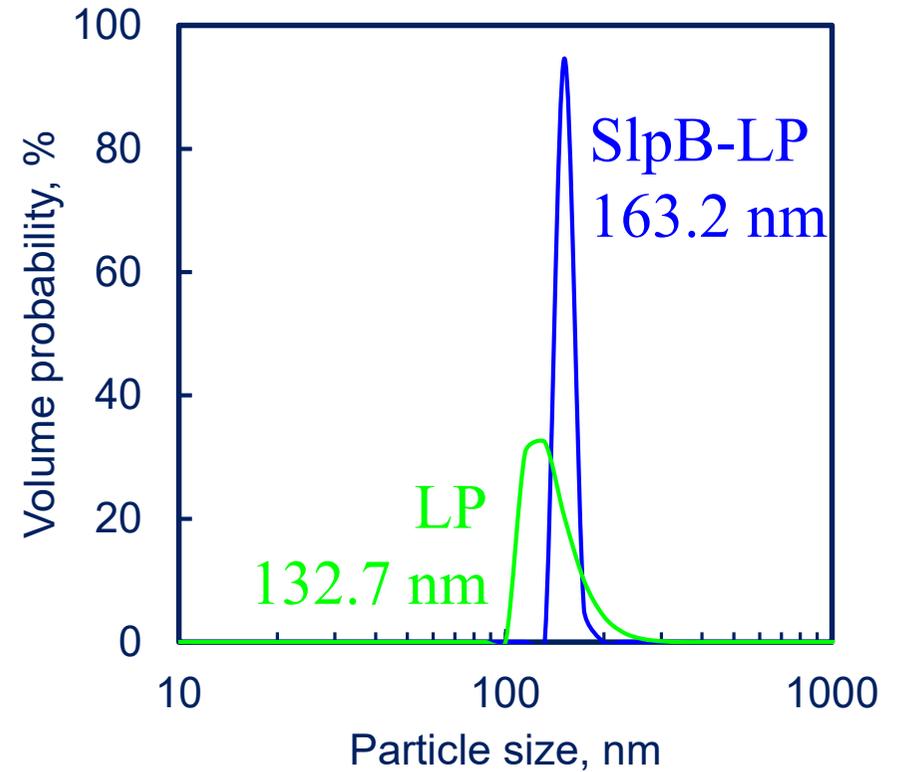
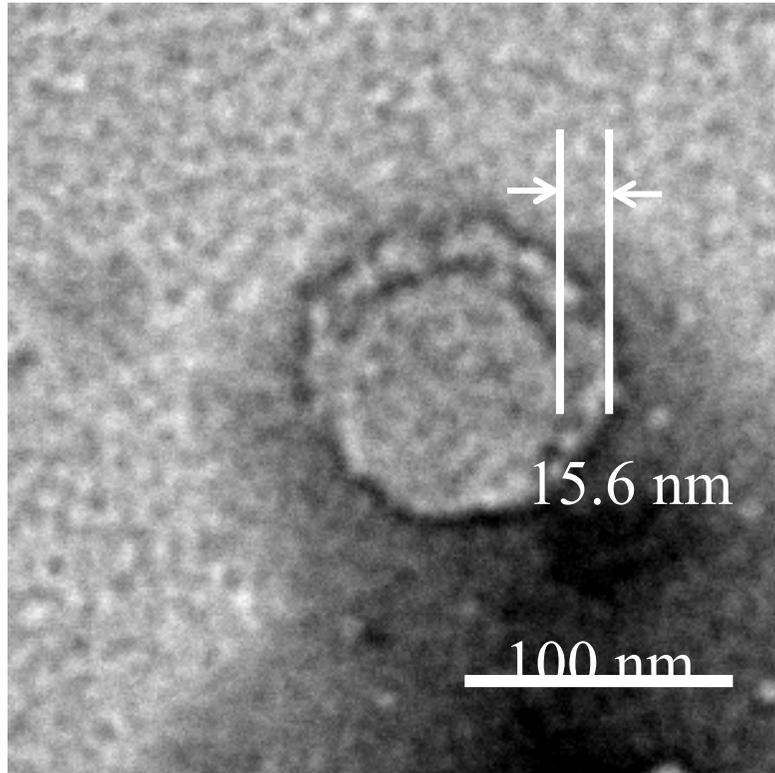
Probioticsの表層蛋白質をリポソームに応用
(SlpBのコーティングによるDDSに利用)

リポソームへのSlpBのコーティング

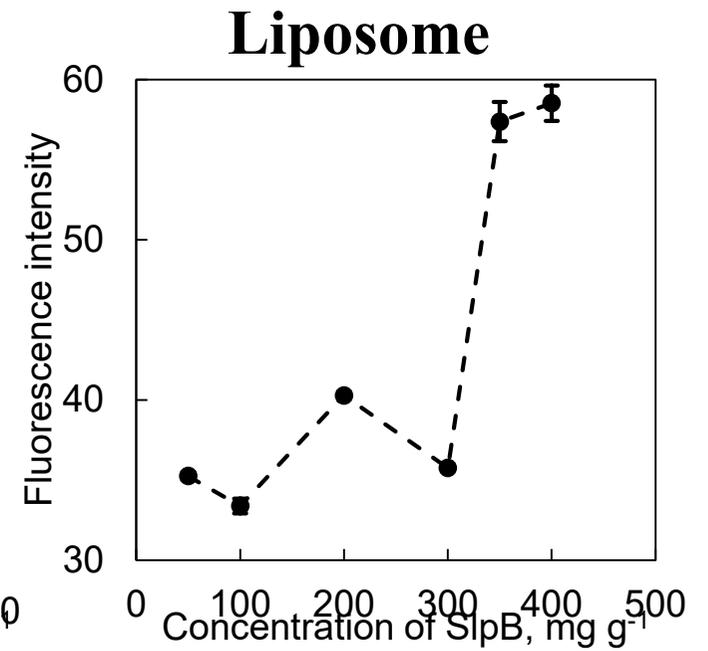
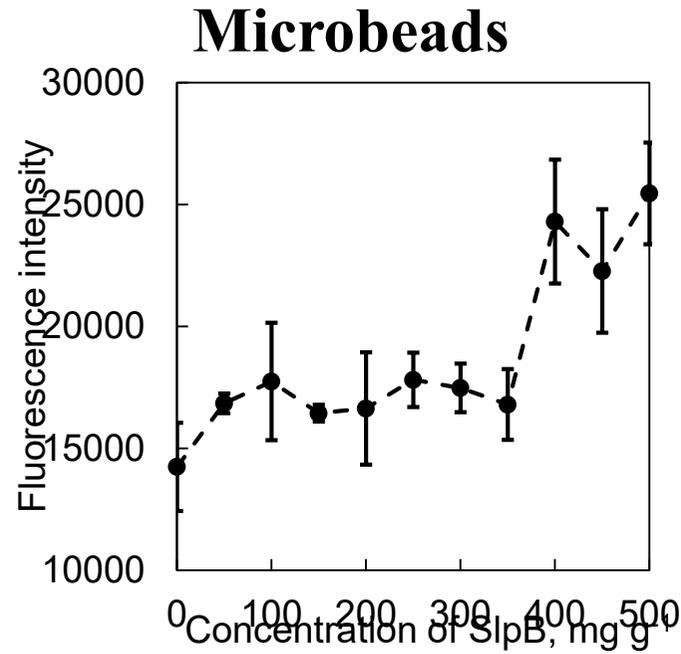
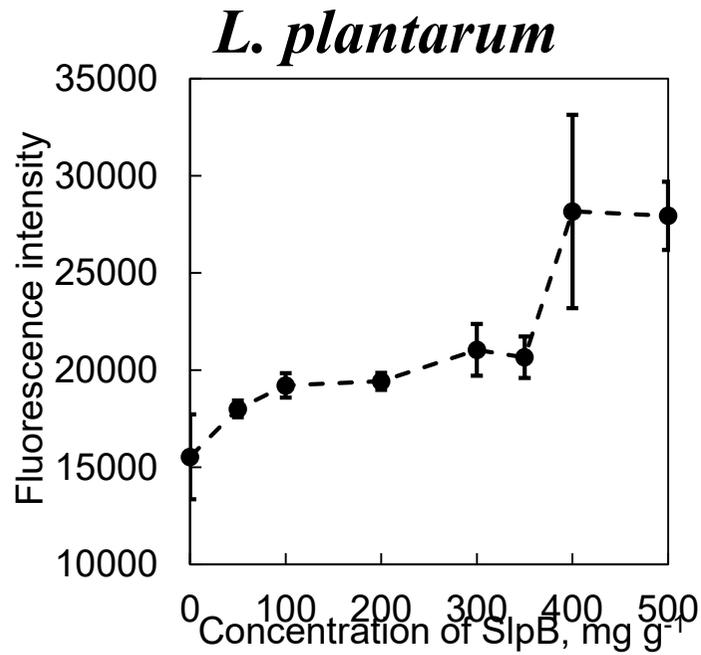
The adsorption capability of SlpB on liposomes was evaluated with electrophoretic mobility of liposome.



SlpBをコートしたリポソームのサイズ



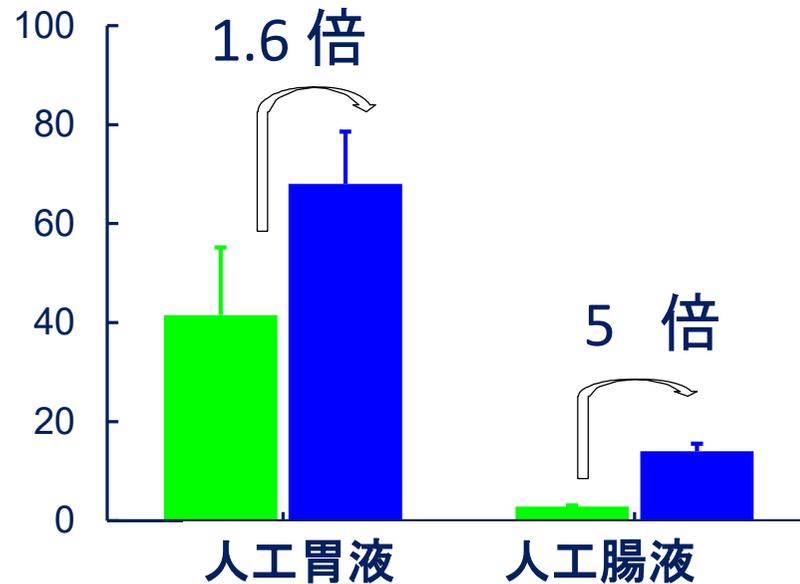
SlpBのリポソーム、マイクロビーズへの結合



(n = 3, mean ± SD)

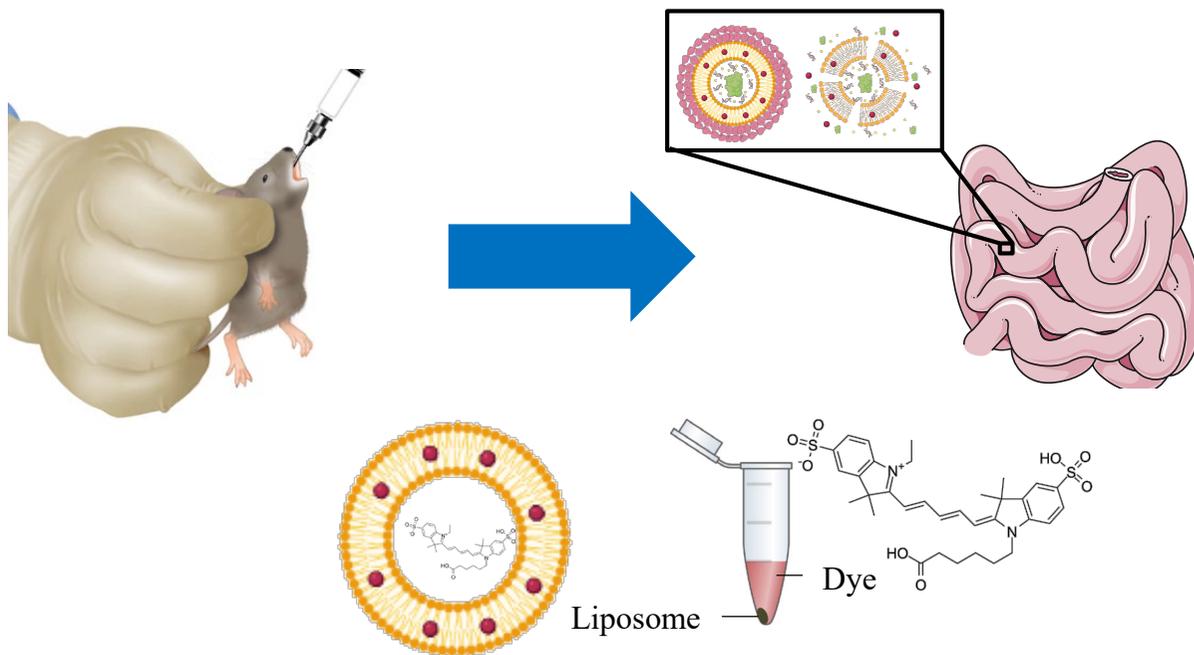
課題解決(1)

SlpBコートによる安定性大幅改善

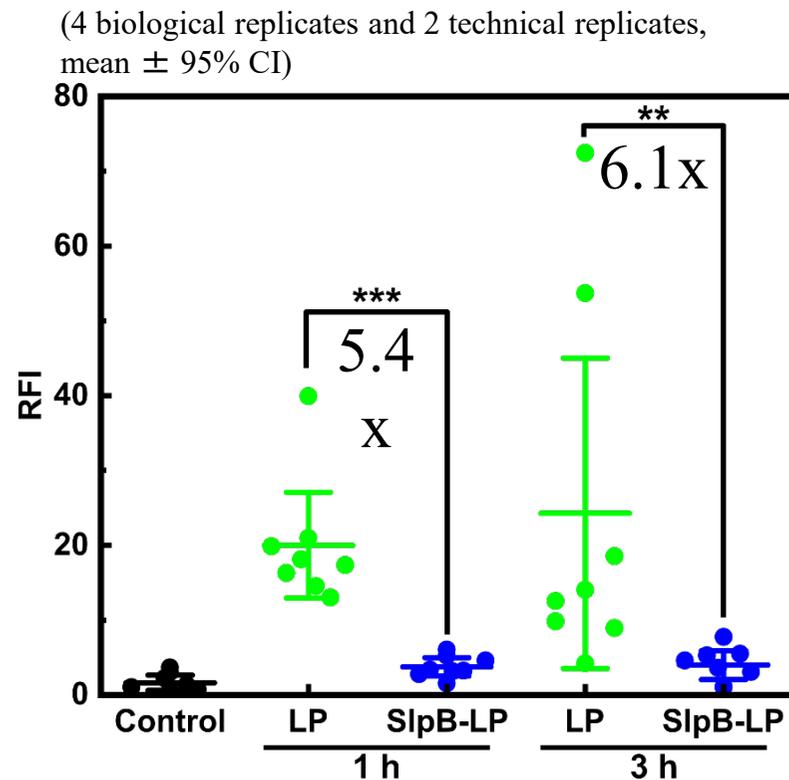


Incubation in each condition at 37° C for 60 min ($n = 3$, mean \pm SD)

Slp-LPの生体内での安定性

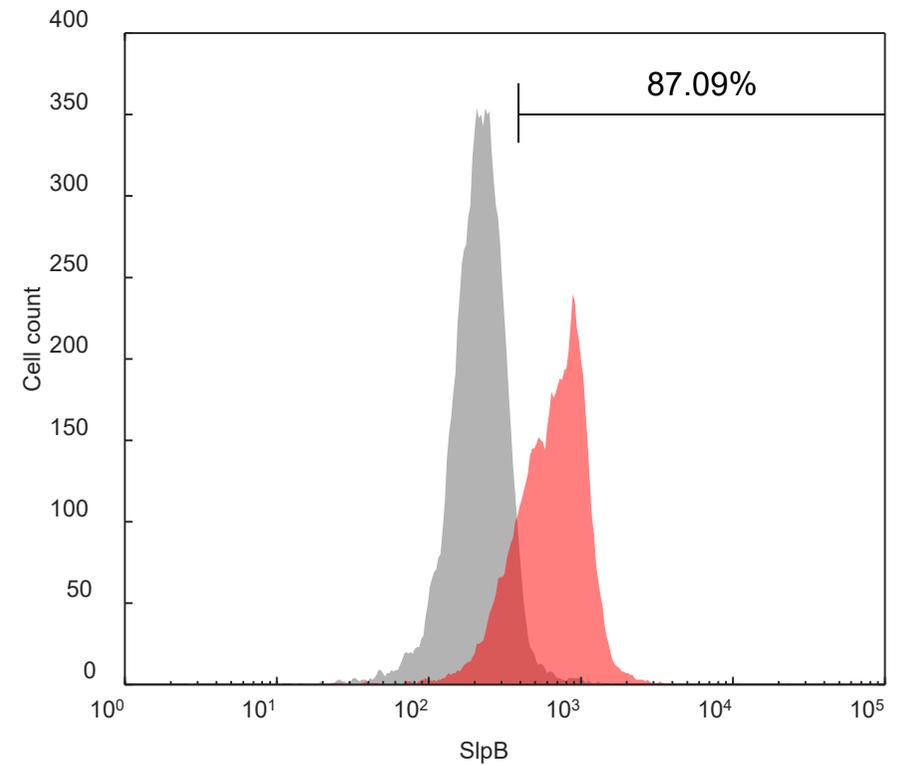
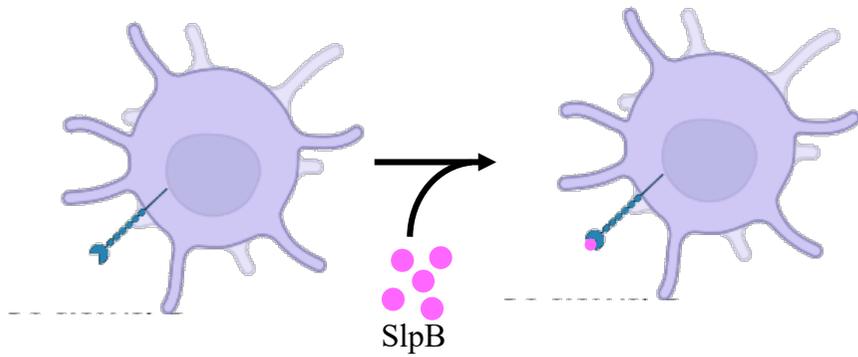


リポソームから遊離する
蛍光量で破壊量を評価

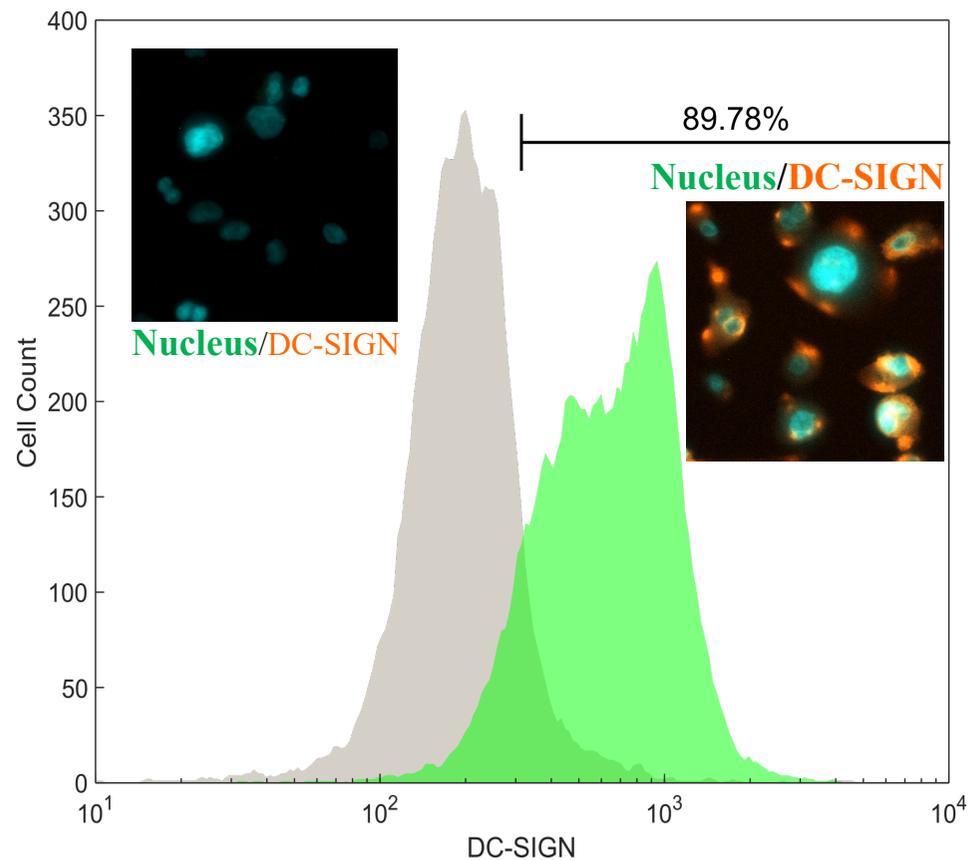
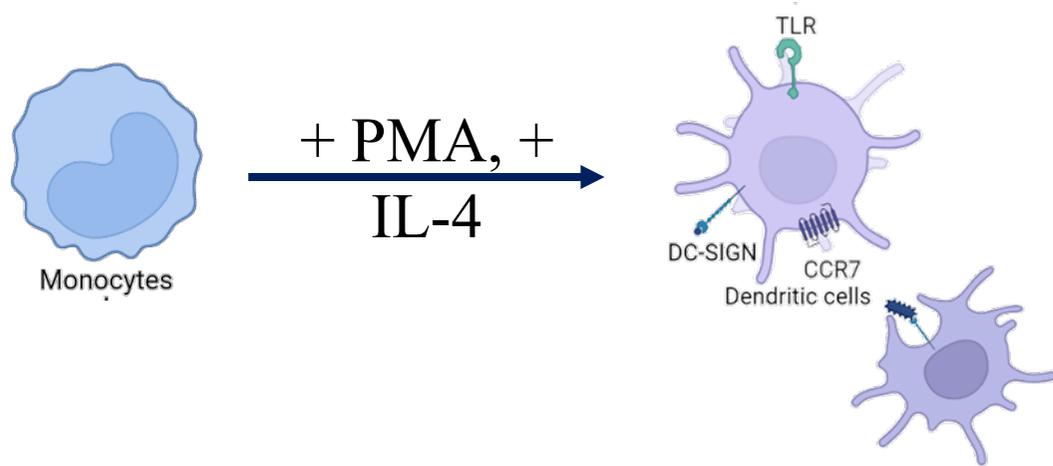


課題解決(2)

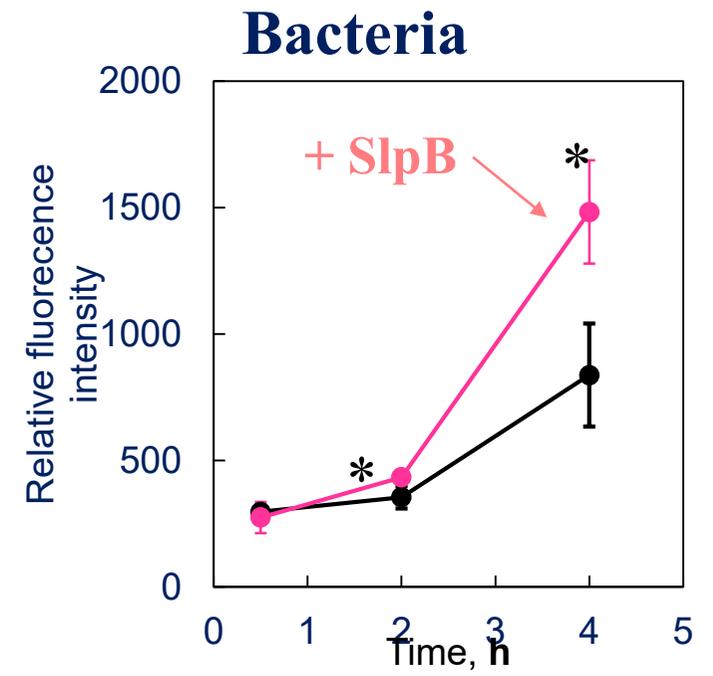
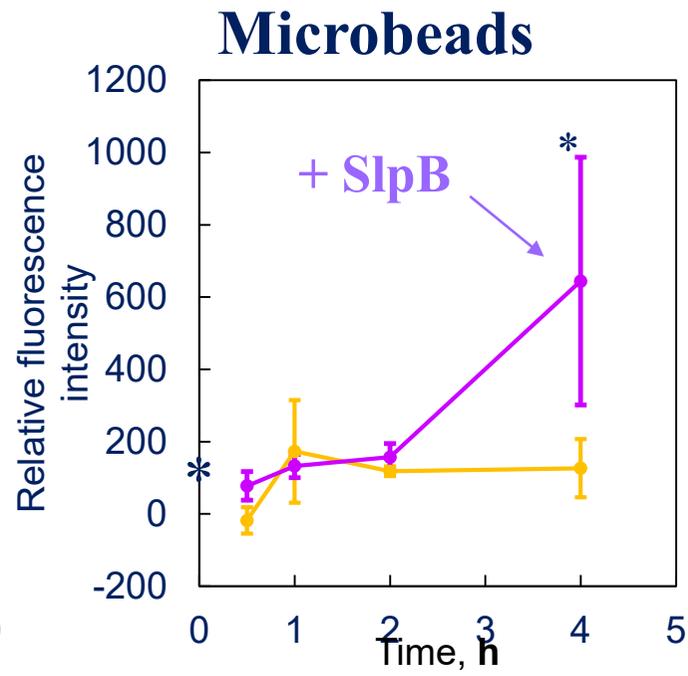
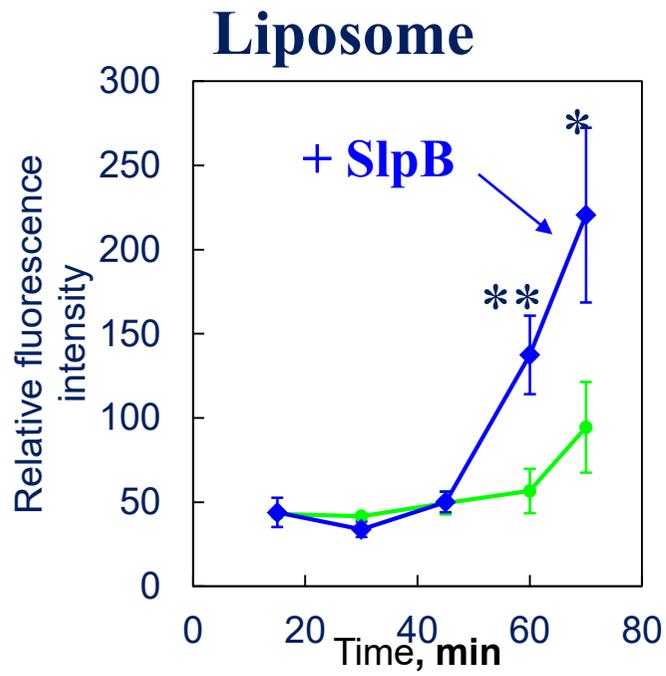
SlpB の樹状細胞への結合



Flow cytometry analysis



SlpB-LPの樹状細胞への取り込み



($n = 3$, mean \pm SD)

SlpB-コートにより樹状細胞取り込み増

SlpB-LPのパイエル板へのデリバリー

60 min after administration with (SlpB-)LP, mice were euthanised and intestines were isolated and fixed immediately. Then, Peyer's patches were isolated, and cryosection was prepared.

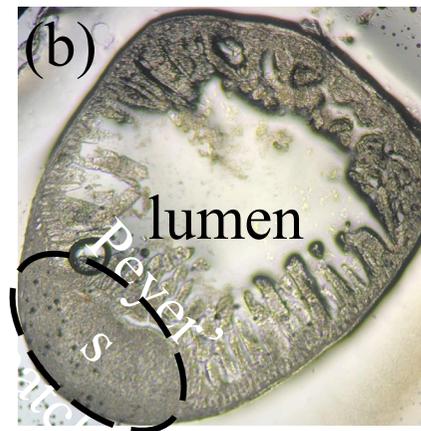
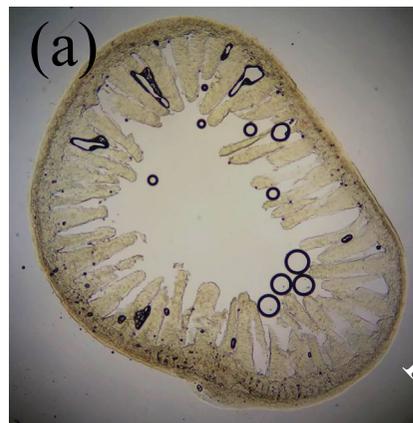
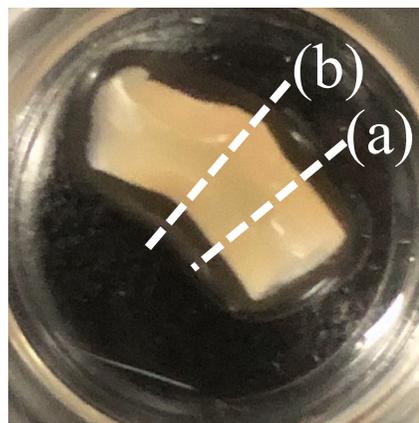


Oral administration of LP

400 μ g LP, 8 μ g
Cy³OVA
60 min

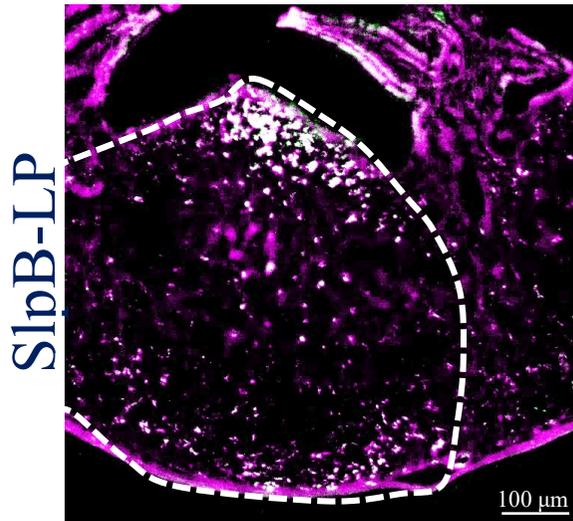
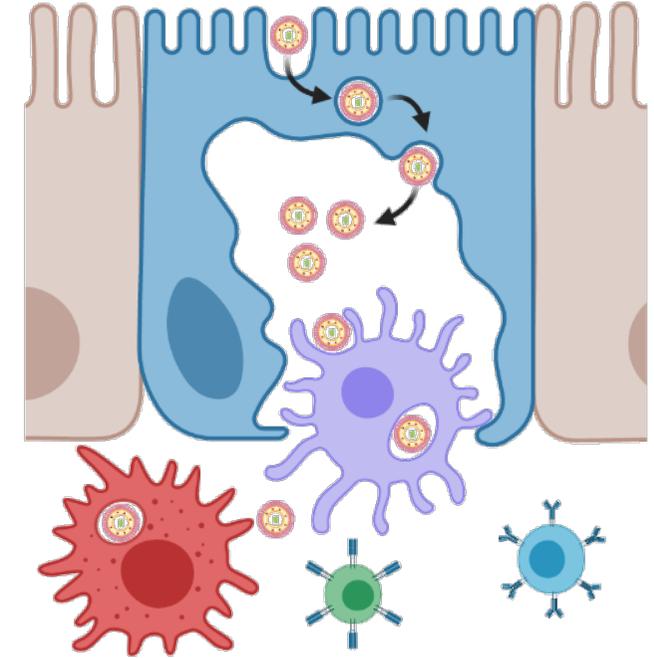
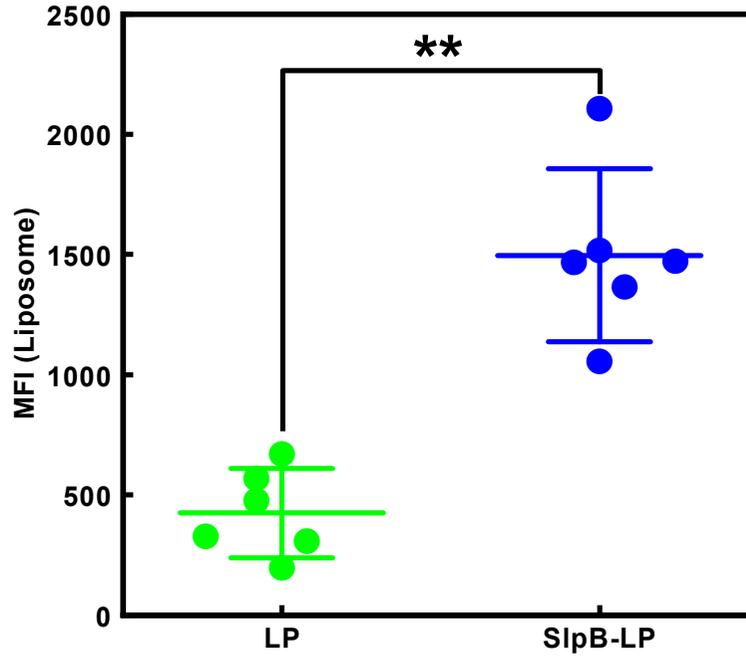
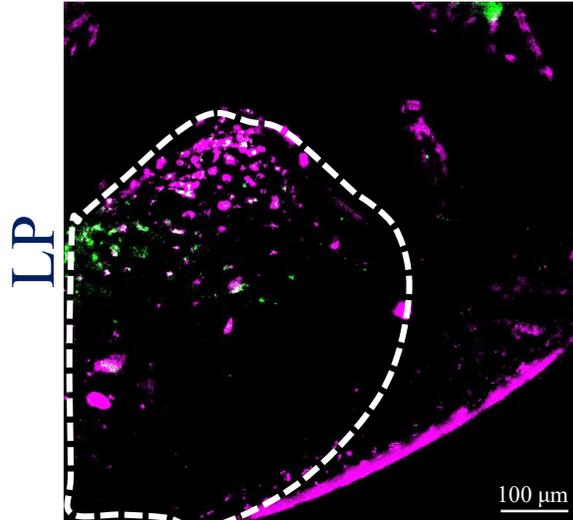


Sacrifice of mice and isolation of small intestines

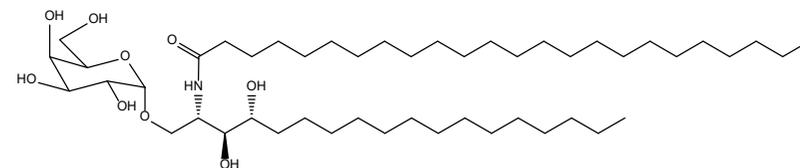


抗原提示細胞への取り込み

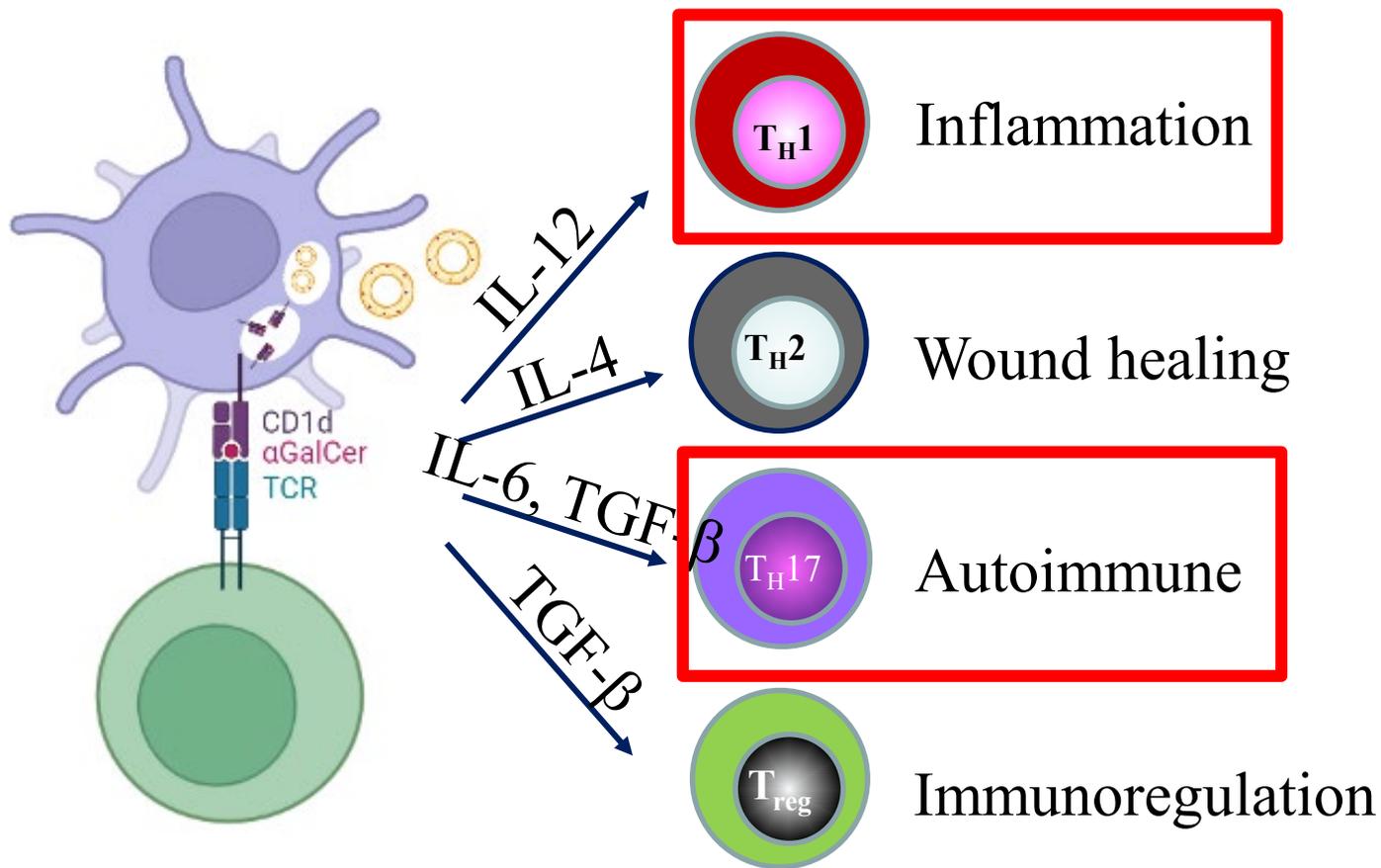
CD23 (APCs) / LP



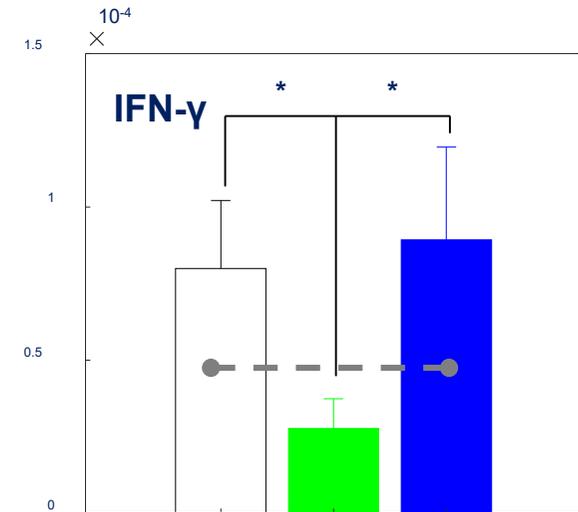
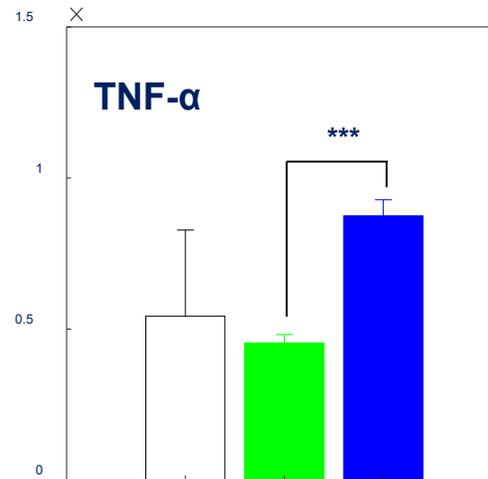
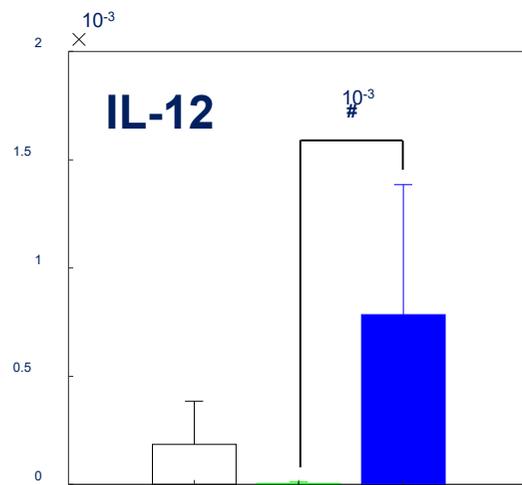
免疫調節剤 α -GCの内封利用



(2*S*, 3*S*, 4*R*)-1-*O*-(α -D-galactopyranosyl)-16-methyl-2-[*N*-((*R*)-2-hydroxytetraacosanoyl)-amino]-1,3,4-heptadecanetriol
Trade name: α -GalCer, KRN7000



α GC SlpB-LP 投与によるサイトカイン誘導 (*in vivo*)

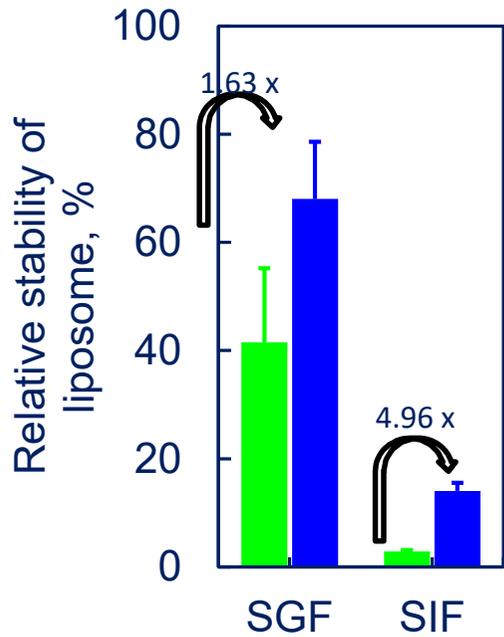


(8 μ L α GC LP, $n = 3$, mean \pm SD)

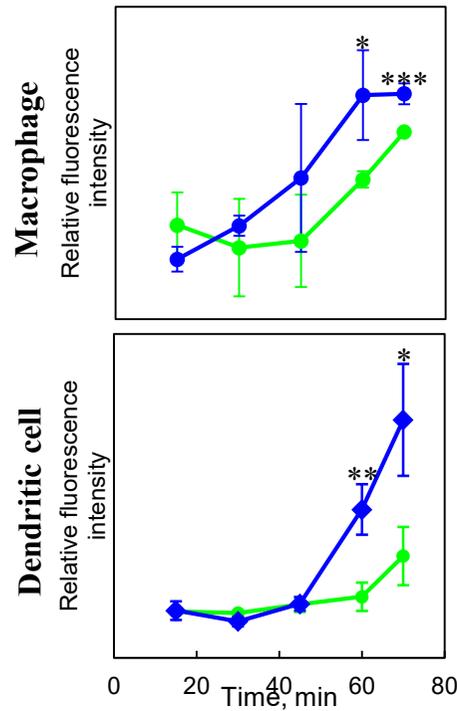
- Control
- α GC LP
- SlpB- α GC LP

SlpB-LP の有用性まとめ

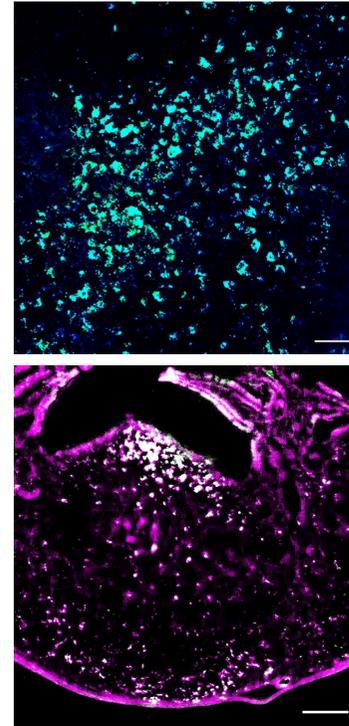
①リポソームの安定化



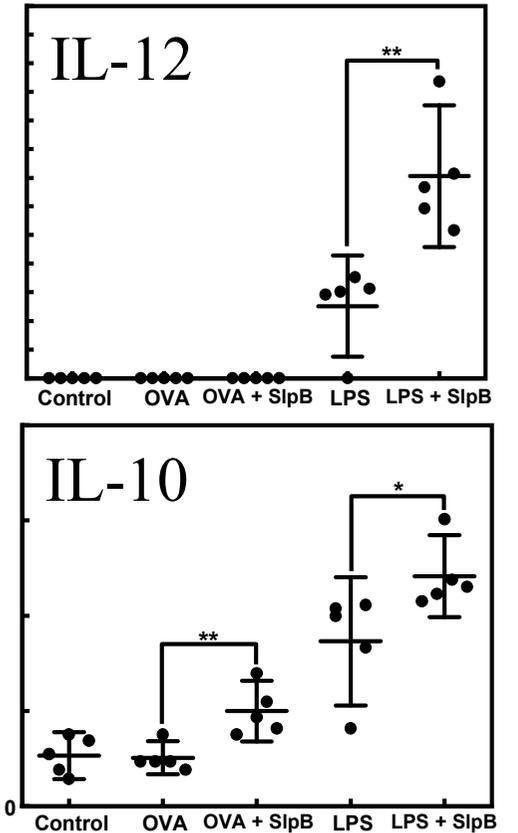
②抗原提示細胞への取込



③パイエル板への取込



④サイトカイン誘導



新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来技術の問題点であった、経口投与におけるリポソームの安定性を5倍以上改良することに成功した。
- また、パイエル板への取り込み能を顕著に効率化し、免疫調節効果を有意に高めることに成功した。
- 本技術の適用により、薬効を5倍程度に高める素材が提供でき、腸管免疫への特異的作用が期待される。

想定される用途

- 本技術の特徴を生かすためには、リポソーム内封薬剤の製造に適用することで安定性や組織特異性のメリットが大きいと考えられる。
- 上記以外に、機能性成分の効果が得られることも期待される。
- また、達成された薬理効果に着目すると、ワクチンやアレルギーといった分野や用途に展開することも可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、リポソームの製造方法についてラボスケールでの研究開発が修了済。しかし、その応用利用についてのデータ蓄積が不足している。
- 今後、多くの症例を蓄積し、実用利用への具体化を進めていく。

企業への期待

- 未解決の応用利用領域の開発については、今後の共同研究により克服できると考えている。
- 経口投与による薬剤の効率的デリバリーに興味を持つ企業との共同研究を希望。
- 特に、免疫調節成分を開発中の企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 乳酸菌表層タンパク質担持リポソーム及びその製造方法
- 出願番号 : 特願2022-079070
- 出願人 : 東京工業大学
- 発明者 : 山本 直之、陳 政霖

お問い合わせ先

東京工業大学

研究・産学連携本部 知的財産部門

T E L 03-5734-2445

F A X 03-5734-2482

e-mail sangaku@sangaku.titech.ac.jp