様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：８２６２６
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：１５K１２４９８

研究課題名（和文）DDS技術を活用した脂肪組織免疫寛容誘導機構の解明と新治療戦略の創出

研究課題名（英文）Mechanism for induction of immune tolerance in adipose tissue and development of a novel strategy for treatment of obesity

研究代表者
梶本　和昭（Kajimoto, Kazuaki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：１０４１６２１６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、研究代表者らが開発した脂肪組織の血管に対する選択的なナノ送達システム（ナノDDS）を活用し、脂肪血管にアポトーシスを誘導した際に組織内で引き起こされる反応と肥満治療効果との関連性を明らかにすることを目指して研究を開始した。脂肪組織中に存在するマクロファージ、制御性T細胞、iNKT細胞の割合を定量的に評価する系を確立するとともに、これらの細胞の機能をin vivoで評価するために必要なナノDDSを大量調製する手法を開発した。現在、メカニズムの解明に向けて機能評価を進めている。

研究成果の概要（英文）：We started this study to clarify a relationship between immunological reactions in adipose tissue caused by apoptosis of the adipose vasculature and anti-obesity effects of the adipose vessel-targeted nano DDS (drug delivery system). We established a quantitative method for evaluation of changes in macrophages, regulatory T cells and iNKT cells in adipose tissue by flow cytometry. In addition, we succeeded to develop a new method of large-scale preparation of the nano DDS for in vivo functional evaluation of cells of the immune system in adipose tissue. The functional assessments are being proceeded to elucidate the molecular mechanisms.

研究分野：薬物送達学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム　リポソーム　肥満　脂肪組織　血管

１．研究開始当初の背景

肥満は、脂肪組織における慢性的な炎症からインスリン抵抗性を惹起し、全身の糖・脂質代謝機能を低下させることで糖尿病や動脈硬化を引き起こす要因となるため、新たな治療法・予防法の開発が強く望まれている。

研究代表者は、肥満の本体である脂肪組織の肥大化に血管新生が必須であることに着目し、脂肪組織に栄養と酸素を供給する血管の機能を制御できれば効果的な肥満治療が可能になると考えた。このような作業仮説のもと、脂肪血管の膜上に発現する prohibitin に対する高親和性ペプチドを標的化リガンドとして利用し、能動的ターゲティングによる脂肪血管選択的なリポソーム型ナノ送達システム（Prohibitin-Targeted Nano Particle: PTNP）の開発に世界で初めて成功した。さらに、アポトーシス誘導剤を内封した PTNP を肥満モデルマウスに投与することで、脂肪組織中の血管密度低下および体重の減少が認められ、新たな肥満治療法として「脂肪組織の血管を標的とするナノ医療戦略」を世界に先駆けて提唱した。

当初、「脂肪組織に栄養と酸素を供給する血管を標的として脂肪細胞を兵糧攻めにする」という作用機序を想定していた。しかし、PTNP を肥満マウスに投与した際、単に脂肪組織が縮小するだけでなく、脂肪組織におけるマクロファージの集積が顕著に減少すること、さらに、摂食量に大きな変化がないにも関わらず脂肪肝が有意に改善することが明らかとなり、PTNP による肥満治療には全く未知のメカニズムが関与する可能性が強く示唆された。肥満の脂肪組織では CD8 陽性（細胞障害性）T 細胞の浸潤が増加しているとの報告もあり、本来は起こらないはずの自己抗原に対する免疫応答が活性化していると考えられる。これらのことから、研究代表者は「PTNP は脂肪血管内皮細胞のアポトーシスを介して、脂肪組織特異的な免疫寛容を誘導することで炎症の軽減や代謝の改善をもたらしたのではないか？」との新たな仮説を持つに至った。

２．研究の目的

本研究では、「脂肪組織の血管にアポトーシスを誘導すると、これを起点として組織特異的免疫寛容が誘導され、肥満に起因する脂肪組織炎症が軽減し、インスリン抵抗性や糖・脂質代謝異常の改善につながる」との作業仮説に基づき、研究代表者らが独自に開発した脂肪血管選択的 DDS 技術を活用して *in vivo* で仮説を証明するとともに、分子メカニズムを解明する。また、経口投与による免疫寛容誘導法を開発し、脂肪組織免疫寛容療法という全く新しい戦略に基づく肥満・生活習慣病の治療法を世界に先駆けて確立することを目的とする。

３．研究の方法

(1)フローサイトメトリーを用いた炎症性マクロファージ、制御性 T 細胞、iNKT 細胞の定量解析

C57BL/6J、C57BL/6J-DIO、および db/db マウス（8～20 週令、雄性）の精巣上体白色脂肪組織を摘出し、コラゲナーゼ（TypeII）処理を行い、遠心分離により成熟脂肪細胞を含む浮遊細胞層を除去した。沈殿を HBSS で洗浄した後、赤血球を溶血により除去し、Histopaq-1077 を用いた密度勾配遠心により脂肪組織由来の間質-血管細胞画分を調製した。調製した細胞画分に含まれる炎症性マクロファージ、制御性 T 細胞、iNKT 細胞を検出するために、FcR blocking reagent で前処理した後、以下の蛍光標識抗体を反応させた。

・炎症性マクロファージ：FITC 標識抗 CD11c 抗体、PE 標識抗 F4/80 抗体

・制御性 T 細胞：FITC 標識抗 CD4 抗体、PE 標識抗 CD127 抗体、PE-Cy7 標識抗 CD25 抗体

・iNKT 細胞：FITC 標識抗 CD3e 抗体、PE 標識αGC-loaded CD1d Tetramer

(2)PTNP のスケールアップ調製法の最適化

二段階乳化による W/O/W エマルジョンの調製と液中乾燥による有機溶媒の留去でリポソームを調製した。内水相（W1 相）には 2 mM シトクロム C 溶液（PBS, pH7.4）、有機相（O 相）には 100 mM EPC/Chol(2/1)溶液、外水相（W2 相）には 25 μM DSPE-PEG$_{2k}$、 31.25 μM DSPE-PEG$_{5k}$、75 μM PEG-MOE を含む PBS(pH7.4)を使用した。一次乳化はプローブ型ソニケーターを使用した超音波処理、二次乳化は SPG 膜モジュールを使用した膜乳化法で行った。液中乾燥後、粗リポソーム懸濁液を 200 nm PC 膜を用いたエクストリュージョンにて整粒し、300K MWCO の CE 膜を用いた透析により未封入のシトクロム C を除去した。得られたリポソームの粒子径およｂゼータ電位はゼータサイザー（マルバーン社製）を用いて測定し、シトクロム c 封入率は吸光度（408 nm）測定により算出した。

(3)W/O/W エマルジョン法で調製した PTNP の脂肪血管への in vivo 送達

シトクロム C の代わりに水溶性蛍光色素であるローダミンを封入した PTNP を上記と同様にして調製し、C57BL/6J マウス（9 週令、雄性）に尾静脈注射により投与した（0.125 mmol lipids/kg body weight）。投与から約 24 時間後に血管を可視化するための FITC-イソレクチン B4 を尾静脈注射により投与し(50 μg/マウス)、30 分後に脂肪組織を摘出し、組織片を Hoechst33342 溶液に浸漬して細胞核を染色した。30 分の染色後、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。

４．研究成果

(1)脂肪組織中の免疫担当細胞の定量的検出条件の検討

①炎症性マクロファージ

炎症性マクロファージは F4/80 および CD11c が共に陽性であり、肥満に伴って脂肪組織への浸潤が増加することが知られている。野生型マウスでは F4/80 陽性細胞のうち約 45%が CD11c 陽性であったのに対し、db/db マウスでは約 96%であり、脂肪組織中に存在するマクロファージのほとんどが炎症性マクロファージであることが判明した（図 1）。

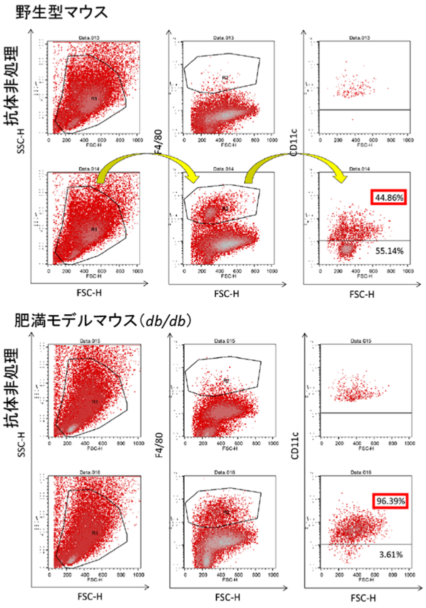

図 1. 脂肪組織中の炎症性マクロファージの定量検出

②制御性 T 細胞

免疫寛容の中心的役割を担う制御性 T 細胞は CD4 陽性 T 細胞のうち CD25 を高発現しており、転写因子 FoxP3 が特徴的に発現していることが知られている。また、CD127 は FoxP3 の発現と逆相関を示し、制御性 T 細胞の検出に有用との報告もある。そこで、CD4 陽性、CD25 陽性、CD127 低発現の細胞群の検出を試みた。脂肪組織中の制御性 T 細胞は、肥満に伴ってその割合が減少することが知られている。実際に、野生型マウスと同系統の高脂肪食誘導性肥満マウスの脂肪組織から間質-血管細胞画分を調製し、制御性 T 細胞の割合を調べた結果、野生型マウスでは CD4 陽性細胞のうちの約 33%、肥満マウスでは約 15%が制御性 T 細胞であり、これまでの報告と一致する結果が得られた（図 2）。

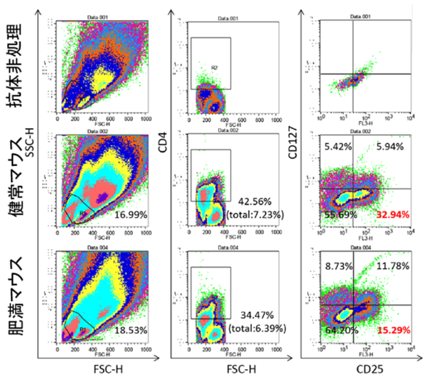

図 2. 脂肪組織中の制御性 T 細胞の定量検出

③iNKT 細胞

iNKT 細胞は、NK 細胞と T 細胞の特徴をあわせ持つ細胞であり、抗原提示細胞に発現する CD1d 上に提示された α-Galactsylceramide（α-GC）を特異的に認識する T 細胞受容体を有することが知られている。T 細胞マーカーである CD3 陽性、CD1d-α-GC 複合体陽性細胞の検出を試みた。その結果、野生型マウスの脂肪組織中で CD3 陽性細胞（T 細胞）のうち約 6%が αGC-loaded CD1d Tetramer に対する結合能を有する iNKT 細胞であることが判明した（図 3）。

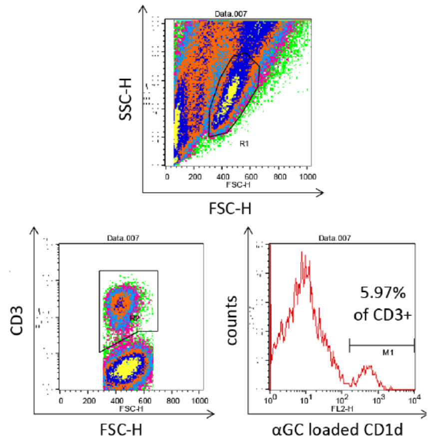

図 3. 脂肪組織中の iNKT 細胞の定量検出

(2)PTNP スケールアップ調製法の最適化

これまでの研究では、PTNP 調製法として逆相蒸発法を使用してきたが、0.5～1 ml 程度の容量でしかリポソームを調製できない上に、水溶性タンパク質であるシトクロム C の封入率が数～10%程度と低く、in vivo での検討を長期にわたって行うには適していないという問題があった。本研究で目的とする in vivo 検討を再現良く行うためには、PTNP の調製法を改良し、スケールアップと封入率の向上を両立できる調製法を確立する必要がある。そこで、研究開始当初の予定にはなかったが、スケールアップ調製法の確立とその最適化を試みた。

一次乳化の際、リポソーム構成脂質を溶解する有機溶媒として n-ヘキサンを使用していたが、その場合、シトクロム C を含む W1 相と混合して超音波処理を行っても全くエマルジョンが調製できず、即座に相分離してしまった。安定なエマルジョンを調製することを目的として、脂質を溶解する有機溶媒に n-ヘキサンをベースとして種々の溶媒を適量加えた混合溶媒使用したところ、100 nm 以下の非常に安定な W1/O エマルジョンを調整することができた。

得られた W1/O エマルジョンを SPG 膜乳化法により W2 相へ穏やかに注入し W/O/W エマルジョンを調製した。室温、大気圧下で 24 時間撹拌することにより有機溶媒を揮発させ、粗リポソーム懸濁液を得た。粗リポソームの粒子径は 200 nm 程度、多分散指数は 0.4 前後であり、サイズダウンと均一性の向上が

必要であった。そこで、200nm PC 膜を用いてエクストリュージョンを行い、整粒したところ粒子径は 140nm 程度、多分散指数は 0.15 前後となり、これまで逆相蒸発法で調製していた PTNP とほぼ同等の物性を有するリポソームが調製できた。
得られたリポソームを 300K MWCO の CE 膜を用いて透析し、未封入のシトクロム C を除去し、吸光度測定により封入率を算出した。その結果、非常に興味深いことに、エマルジョン調製過程で脂質を溶解する有機溶媒の組成によって封入率が全く異なることが判明し、n-ヘキサン/ジクロロメタン(3/1, v/v)を使用した場合に 50%程度と最も封入率が高くなることを見出し、逆相蒸発法と比べて数～10 倍程度の封入率の向上に成功した(図 4)。新たに確立したリポソーム調製法に関する論文を投稿中である。

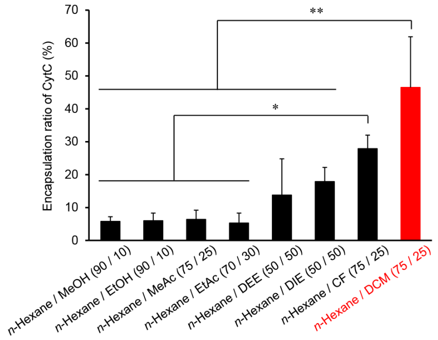

図 4. シトクロム c 封入率に対する溶媒組成の影響

(3) W/O/W エマルジョン法で調製した PTNP の脂肪血管への in vivo 送達
研究代表者らの以前の研究で、PTNP を逆相蒸発法以外の方法（単純水和法）で調製した際に、脂肪血管への標的可能が著しく減弱することが分かっていたため、W/O/W エマルジョン法で調製した PTNP が in vivo で脂肪血管への移行能を保持しているか否かを確認する必要があった。そこで、薬効成分であるシトクロム C の代わりに水溶性蛍光色素ローダミンを封入した PTNP を最適化した W/O/W エマルジョン法で調製し、野生型マウスに尾静脈より投与して脂肪組織への集積を調べた。標的化リガンドを搭載していない PEG 化リポソームを同様に調製し、比較対照として用いた。その結果、投与 24 時間後において、PTNP は脂肪組織の血管に高度に集積していたのに対し、PEG 化リポソームの集積はほとんど認められなかった。以上の結果から、本研究で新たに確立した W/O/W エマルジョン法によって調製した PTNP は、逆相蒸発法と同様に in vivo における脂肪血管への標的化能を有することが明らかとなった（図 5)。
PTNP のスケールアップ調製法の確立によそ以上の時間がかかってしまったために、予定していた抗肥満効果と免疫抑制性細胞群との関連性に関する検討を行うまでに至らなかった。現在、機能評価を勧めている段階である。

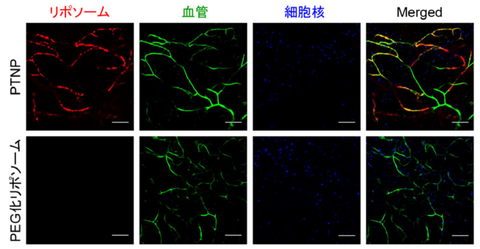

図 5. W/O/W エマルジョン法で調製した PTNP の脂肪血管への in vivo 送達

５．主な発表論文等
該当なし

６．研究組織
(1)研究代表者
梶本　和昭（KAJIMOTO, Kazuaki）
国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員
研究者番号：10416216