

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18851

研究課題名(和文) 磁場を利用したM2型マクロファージの選択的送達に基づく炎症性腸疾患治療法の開発

研究課題名(英文) Development of magnetically guided M2 macrophages-based cell therapy for inflammatory bowel disease

研究代表者

河野 裕允 (Kono, Yusuke)

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号：60732823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージを利用した炎症性腸疾患治療法を構築するためには、抗炎症作用を有するマクロファージを効率的に大腸へ送達する技術の開発が必要である。本研究では、外部磁場応答性リポソーム/プラスミドDNA複合体を導入したマクロファージが磁場付加部位へ高効率に集積すること、および本磁活性化マクロファージが周囲に存在するマクロファージを抗炎症性の表現型に転換させる作用を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the macrophages-based cell therapy for inflammatory bowel disease, it is necessary to construct the colon-selective cell delivery system. In this study, we have succeeded in efficiently delivering magnetic liposomes/plasmid DNA complexes-introduced macrophages to the region where an external magnetic field is exposed. In addition, we have demonstrated that these macrophages exhibit anti-inflammatory M2 phenotype, and have an ability to convert the phenotype of surrounding macrophages to M2.

研究分野：医歯薬学

キーワード：磁場応答性リポソーム 細胞送達システム M2型マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

炎症性腸疾患 (IBD) は、慢性的に腸に炎症をきたす疾患であり、厚生労働省より特定疾患 (難病) に指定されている。IBD は効果的な治療法が確立されていない治療満足度の低い疾患であるため、発症・進行メカニズムに基づいた画期的な新規治療戦略の構築が強く望まれている。

IBD の発症メカニズムは未だ十分には明らかにされていないが、大腸内に存在するマクロファージが深く関与していることが知られている。腸管マクロファージは、粘膜免疫システムの破綻に伴って活性化し、各種炎症性物質の産生を通して IBD の発症、および進行を促進する。この際、マクロファージの多くが炎症性の M1 型を示しているものと予想されるため、腸管内におけるマクロファージの表現型のバランスを M1 型優位な状態から抗炎症性の M2 型優位な状態に転換することができれば、IBD 患者における炎症反応を顕著に抑制でき、効果的な治療が達成できるものと考えられる。

腸管内におけるマクロファージの表現型を M2 型優位な状態にシフトさせるためには、(1) M2 型に分化させたマクロファージを体外より大腸へ送達する方法と (2) 腸管内のマクロファージを M2 型へ転換する方法が考えられる。これら 2 種の方法を融合した新たな治療戦略として、本報告者は、マクロファージを M2 型へ分化させる作用を有するサイトカインであるマクロファージ-コロニー刺激因子 (M-CSF) を産生する M2 型マクロファージを大腸へ送達する方法を考案した。本治療法は、効率的に大腸内のマクロファージの表現型のバランスを転換することが可能な画期的な手法であると考えられる。しかしながら、本治療法を達成するためには、大腸選択的かつ効率的にマクロファージを送達する技術の開発が必要不可欠である。

本報告者はこれまでに、光刺激や超音波刺激などの外部刺激を利用して医薬品を標的組織選択的かつ高効率に送達することが可能な能動ターゲティング型リポソーム製剤の開発を進めてきた。中でも外部磁場は、磁性を付与した対象物を任意の場所へ引き寄せることが可能であり、本研究で立案した治療法への応用が期待できる。

そこで本研究では、外部磁場を利用した大腸選択的細胞送達システムの構築と、それを利用した M2 型マクロファージによる IBD に対する新規細胞治療法の構築を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では、磁性ナノ粒子を封入したカチオン性リポソームとプラスミド DNA (pDNA) の複合体 (磁性リポプレックス) を作製し、磁性ナノ粒子と pDNA を同時に高効率にマクロファージに導入する手法の開発を行い、本手法により作製した磁性リポプレックス導入マクロファージの大腸組織への接着効率

を評価することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 磁性リポプレックスの作製

磁場応答性カチオン性リポソームは、カチオン性脂質 DOTAP とコレステロールを任意の混合比で混合し、脂質薄膜形成後、ポルテックスミキサーを用いて水和することで調製した。また、本リポソームとルシフェラーゼをコードした pDNA、あるいは M-CSF をコードした pDNA を混合することで磁性リポプレックスを作製した。

### (2) 磁性リポプレックスによる遺伝子発現効率、および細胞毒性の評価

磁性リポプレックスを磁場存在下においてマウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞に添加後、一定時間培養した後、WST-8 アッセイにより細胞生存率を測定した。その後、細胞を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### (3) RAW264 細胞のサイトカイン産生能の評価

磁性リポプレックス導入後、RAW264 細胞を lipopolysaccharide (LPS) により刺激した際の培養上清中の IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , および IL-10 量を ELISA により測定した。また、培養上清中の一酸化窒素量は Griess 法により測定した。また、M-CSF をコードした pDNA を用いて作製した磁性リポプレックスを導入した RAW264 細胞の培養上清を用いて培養した RAW264 細胞における IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , および IL-10 mRNA 発現量を Real time RT-PCR により測定した。

### (4) 磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞の in vitro 接着効率の評価

Calcein-AM により蛍光標識した磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞を 24 ウェル細胞培養プレートに添加し、磁場存在下に置いて 10 分間培養した後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。また、プレートを反転させて条件においても同様の検討を行った。

### (5) 磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞の in vivo 接着効率の評価

磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞をマウスに直腸内投与した後、大腸に対して磁場付加を施した。その後、大腸組織を回収、ホモジネート後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 磁場応答性カチオン性リポソーム/pDNA 複合体 (磁性リポプレックス) の作製と導入条件の最適化

脂質組成の異なる磁場応答性カチオン性リポソームを作製し、それぞれの細胞毒性、および遺伝子導入効率について検討した。カ

チオン性脂質 (DOTAP) およびコレステロールのみを構成成分とする磁性カチオン性リポソームは高い細胞毒性を示した一方で、中性脂質 (DSPC) を任意の割合で混合することにより顕著に細胞毒性を低減できることが示された。また、10~20 mol% の DSPC の添加では遺伝子発現効率の低下は認められなかった (図 1)。よって、磁場応答性カチオン性リポソームの脂質組成比は、DOTAP: DSPC: cholesterol = 4:1:5 (mol) が最適であると決定した。また、複合体作製時におけるリポソームと pDNA の混合比についても検討した結果、リポソーム: pDNA = 10:1 (w/w) で混合した場合に最も高い遺伝子発現効率を得られた。さらに、複合体の細胞内導入時における磁場付加時間について検討を行ったところ、30 分以上の磁場付加により細胞毒性が認められたことから、磁場付加時間は 10 分に設定した。

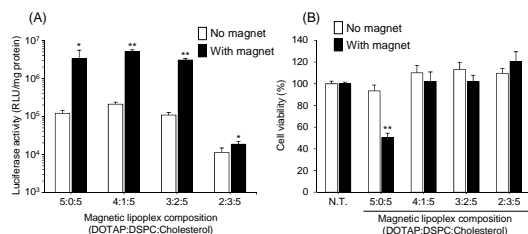


図1. 磁場応答性カチオン性リポソームの脂質組成の最適化。DOTAP, DSPC, およびコレステロールの混合比の異なる磁場応答性カチオン性リポソームによる(A) 遺伝子発現効率、および(B) 細胞毒性を評価した。リポソーム量として10 µg/well添加した。有意差はNo magnetに比べ、\*p<0.05, \*\*p<0.01を示す。

## (2) 磁性リポプレックスの導入に伴う RAW264 細胞の免疫応答の変化

磁性リポプレックス導入後の RAW264 細胞のサイトカイン産生能を評価した。磁性リポプレックスを導入した RAW264 細胞における炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$ 、IL-12、IL-6、および NO 産生量は、未処置の RAW264 細胞と同程度であった。また、抗炎症性サイトカイン IL-10 産生量も顕著な変化は認められなかった (図 2)。本結果より、磁性リポプレックスの導入は RAW264 細胞の免疫応答に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

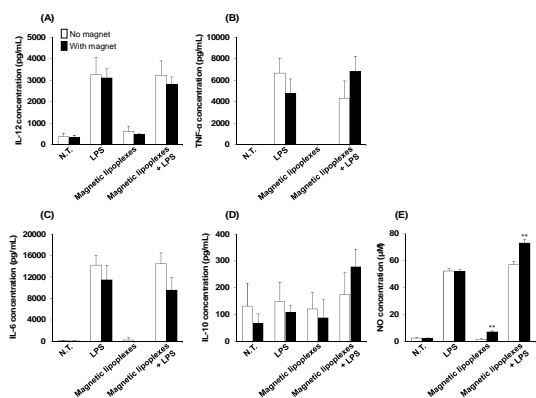


図2. 磁性リポプレックス導入RAW264細胞のサイトカイン産生能の評価。磁性リポプレックス導入後(時間経過)におけるLPS刺激したRAW264細胞からの(A) IL-12、(B) TNF- $\alpha$ 、(C) IL-6、(D) IL-10、および(E) NO 産生量を測定した。有意差はNo magnetに比べ、\*\*p<0.01を示す。

また、M-CSF をコードした pDNA を磁性リポプレックスを用いて導入した結果、RAW264 細胞より M-CSF が産生されることが確認できた。さらに、TNF- $\alpha$ 、IL-12、および IL-6 産生量が有意に減少するとともに、IL-10 産生量が顕著に増大した。本結果より、M-CSF をコードした pDNA を導入することで、RAW264 細胞が M2 型の表現型を示すことが明らかとなった。

## (3) 磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞が周囲のマクロファージに及ぼす影響の評価

M-CSF をコードした pDNA を用いて作製した磁性リポプレックスを導入したマクロファージのパラクリン作用による周辺マクロファージの表現型の変化を評価した。磁性リポプレックス導入マクロファージの培養上清を用いて RAW264 細胞を培養した結果、RAW264 細胞における TNF- $\alpha$ 、IL-12、および IL-6 mRNA 発現量が顕著に減少し、また、IL-10 mRNA 発現量の有意な増大が認められた。よって、磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞のパラクリン作用により自身のみでなく、周囲のマクロファージの表現も M2 型にシフトできることが示唆された。

## (4) 磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞の in vitro 接着効率の評価

磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞の培養プレートに対する接着効率を評価した。磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞の接着率は、磁場存在下において顕著に増大した (図 3)。また、プレートを反転させた条件においても検討を行ったところ、重力と反対方向でも磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞は磁場に引き寄せられ、プレートに接着することが明らかとなった。

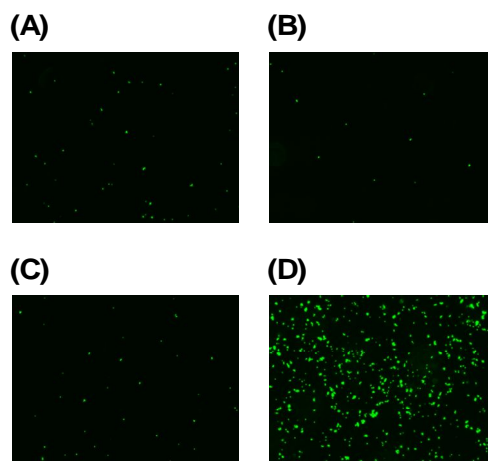


図3. 磁性リポプレックス導入RAW264細胞のin vitro 接着効率の評価

蛍光標識したRAW264細胞の(A) 磁場非存在下、および(B) 磁場存在下、並びに蛍光標識した磁性リポプレックス導入RAW264細胞の (C) 磁場非存在下、および(D) 磁場存在下における細胞培養プレートに対する接着を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### (5) 磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞の マウス大腸における接着効率の評価

磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞をマウスに対して直腸内投与した後の大腸内接着効率を評価した。大腸に対して磁場付加を施した場合、大腸内における磁性リポプレックス導入 RAW264 細胞の接着率が顕著に増大した (図 4)。また、本細胞の大腸内における滞留時間も有意に延長した。

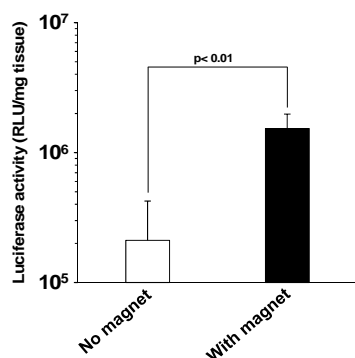


図4. 磁性リポプレックス導入RAW264細胞のマウス大腸に対する接着効率の評価

磁性リポプレックス導入RAW264細胞  $1 \times 10^6$  cells をマウスに対して注腸投与した6時間後、大腸を摘出し、磁性リポプレックス導入RAW264細胞由来のLuciferase活性を測定した。

以上、磁性リポプレックスを利用することで、マクロファージに対して磁性ナノ粒子と pDNA を同時に低毒性かつ高効率に導入することに成功した。また、本磁性リポプレックス導入マクロファージと外部磁場を併用することで、標的組織へ効率的に細胞を集積できることを明らかにした。さらに、M-CSF をコードした pDNA を用いることで、磁性リポプレックス導入マクロファージ自身が M2 型を示すと共に、周囲のマクロファージの表現型を M2 型へ転換する作用も発揮することが示された。本研究で得られた知見は、マクロファージを利用した炎症性疾患に対する新規細胞治療法を構築する上で有益な情報を提供するものと考えられる。

#### 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2件)

Yusuke Kono, Saori Miyoshi, Takuya Fujita. Dextran sodium sulfate alters cytokine production in macrophages in vitro. *Pharmazie*. 71, 619-624 (2016) 査読あり

DOI: 10.1691/ph.2016.6688

Satoshi Konishi, Takuya Fujita, Koji Hattosi, Yusuke Kono, Yoshifumi Matsushita. An openable artificial intestinal tract system for the in vitro evaluation of medicines. *Microsystems & Nanoengineering*. 1, 1-6 (2015) 査読あり

[学会発表](計19件)

河野裕允, 藤田卓也, 腸管粘膜を標的とした磁性リポソームを利用した薬物・細胞デリバリーシステムの構築、遺伝子・デリバリー研究会 第16回夏季セミナー (2016年9月13日、やすらぎ伊王島(長崎県長崎市))

河野裕允, 合ヶ坪芹香, 藤田卓也, 細胞接着効率の向上を目的とした磁性マクロファージの作製とその機能評価、第32回日本DDS学会学術集会 (2016年6月30日、グランシップ(静岡県静岡市))

陣在ひと美, 合ヶ坪芹香, 河野裕允, 藤田卓也, マグネタイトを導入したマクロファージにおけるサイトカイン産生能と細胞接着効率の評価、医療薬学フォーラム2016/第24回クリニカルファーマシーシンポジウム (2016年6月25日、びわ湖ホール(滋賀県大津市))

中井健人, 合ヶ坪芹香, 河野裕允, 藤田卓也, 細胞治療への応用を目的としたマクロファージに対する磁性体、遺伝子医薬品同時導入法の構築、医療薬学フォーラム2016/第24回クリニカルファーマシーシンポジウム (2016年6月25日、びわ湖ホール(滋賀県大津市))

合ヶ坪芹香, 河野裕允, 藤田卓也, 磁性リポプレックス導入による RAW264 細胞の免疫応答の変化の評価、日本薬剤学会第31年会 (2016年5月21日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市))

河野裕允, 薬物の腸管上皮細胞内滞留性向上を目的としたリポソームの応用、日本薬剤学会 経口吸収フォーカスグループ 第6回合宿討論会 (2015年12月11日、ホテル金沢兼六荘(石川県金沢市))

Y. Kono, T. Fujita. Effects of Surface Charge and PEG modification of Liposomes on Their Uptake in Caco-2 Cells across Unstirred Water Layer. 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition (2015年10月27日、Orlando (USA))

松岡健太, 河野裕允, 藤田卓也, MDCK 細胞におけるリポプレックスの細胞内取り込みに対する非攪拌水層の影響の評価、医療薬学フォーラム2015/第23回クリニカルファーマシーシンポジウム (2015年7月5日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))

合ヶ坪芹香, 河野裕允, 藤田卓也, 外部磁場に応答するマグネタイト封入マクロファージの作製とその in vitro における機能評価、医療薬学フォーラム2015/第23回クリニカルファーマシーシンポジウム (2015年7月4日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市))

河野裕允, 藤田卓也, Caco-2 細胞表面の非攪拌水層がリポプレックスの細胞内取り込みに及ぼす影響の評価、第31回日本DDS学会学術集会 (2015年7月2日、京王プラ

ザホテル(東京都新宿区)  
三好沙織、河野裕允、藤田卓也、DSS の暴  
露によるマクロファージのサイトカイン  
産生能の変化の評価、日本薬剤学会 第 30  
年会 (2015 年 5 月 21 日、長崎ブリックホ  
ール(長崎県長崎市))

他 8 件

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

河野 裕允 ( KONO YUSUKE )

立命館大学・薬学部・助教

研究者番号 : 60732823

##### (4)研究協力者

藤田 卓也 ( FUJITA TAKUYA )

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号 : 00247785

小西 聡 ( KONISHI SATOSHI )

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号 : 50288627