

## 186. ナノ DDS による免疫・炎症制御と ARDS 治療法の開発

村田 正治

九州大学 先端医療オープンイノベーションセンター

Key words : ナノ DDS, 呼吸器感染症, ARDS, マクロファージ表現型制御, サイトカイン

### 緒言

炎症は外的あるいは内的ストレスに対する応答であり、本来は生体の恒常性を維持するための適応反応と考えられる。炎症はほとんど病態に先行あるいは付随する応答であり、それを制御することで多くの疾患の治療に繋げることが可能である。たとえば新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の中・重症患者の半数が肺全体で強い急性炎症を引き起こし、急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) とよばれる症状を引き起こすことが報告されている [1, 2]。この ARDS は呼吸器疾患の中で最も治療が困難かつ予後不良 (死亡率 30~58%) な病態の一つであり、現在のところ確立した薬物療法は無く、ICU での全身管理が唯一の治療法となっている。この結果、多数の専門性の高い医療スタッフによる治療管理が必要となり、医療体制逼迫の大きな要因となっている。

そこで本研究では、炎症応答における中心的な免疫細胞である炎症性マクロファージを標的化した新しいナノメディシンを開発する。その鍵となるのが、著者らが開発したナノ DDS キャリアである。これは生体由来の機能性分子を親水基とするナノ粒子であり、その表面呈示された機能性分子はマクロファージ特異的に結合する。それだけでなく、ナノキャリアを取り込んだマクロファージの表現系を“炎症性”から“組織修復性”へと機能変換させることができる。本研究においてリポサッカライド (LPS) の気管内投与によって作製した ARDS モデルマウスに対してナノキャリアを投与した結果、期待どおり、サイトカインストームの抑制と肺組織の修復が確認された。

### 方法

#### 1. ARDS モデルマウスの作製

サイトカインストームを誘導するグラム陰性細菌リポ多糖 LPS の投与により ARDS モデルマウスを作製した。肺の CT 画像および病理組織像を観察しながら LPS の投与量 (0~30 mg/kg) と投与経路を種々検討し、ナノキャリアの治療評価に最適なモデルを作製した。LPS の投与経路は噴霧スプレーを使った気管内投与等種々検討したが、経鼻投与がもっとも安定的にモデルマウスを作製することができた。

#### 2. ナノキャリアの作製

両親媒性化合物をクロロホルム/メタノール混合溶液に溶解させた。窒素下で溶媒を除去し、次いでデシケターで乾燥させた。これをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に 10 mg/mL で再懸濁し、バス型超音波発生装置にて 10 分間超音波を照射した。さらに必要に応じて、生理活性分子をキャリアに内包させた。

#### 3. ナノキャリアの体内動態の評価

C57BL/6 雄マウス (8~9 週齢) に LPS (10 mg/kg) を気管内投与し、ARDS モデルを作製した。ナノキャリアの体内動態を調べるため、ARDS モデルに対して、CellBright Red 標識ナノキャリア (5 mg/mL, 25  $\mu$ L) を経鼻投与し、24 時間後、IVIS イメージングシステムにより、主要臓器の体内分布を取得した。肺は 4%パラホル

ムアルデヒドで固定化し、凍結切片を作製し、マクロファージのマーカーである CD68 抗体で免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡にて撮影した。また、LPS 投与後の肺の炎症像はリガク社製マイクロ CT 装置 R.mCT2 によって撮像した。各マウスを麻酔下で伏臥位にし、マイクロ CT 装置で FOV24 mm でスキャンした。データ取得は呼吸サイクルに同期させた。

#### 4. ARDS モデルマウスにおける抗炎症効果の評価

マウスに LPS 投与後、ナノキャリアを経鼻投与し 3 日後、肺胞洗浄液 (BALF) を回収した。その後、BALF から細胞を回収し総細胞数をカウントした。また炎症性サイトカインの解析のために、BALF サンプルの上清画分を回収した。炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\alpha$ 、CCL-5) の測定には、各キットの説明書に記載された手順で行った。肺組織サンプルは病理状態の評価のために、パラフィン包埋して切片化し、H&E 染色を行った。

LPS 投与 3 日後の BALF 中の細胞を回収し、マクロファージマーカーである PerCP Cy5.5-CD11b、APC-F4/80、M1 マクロファージマーカーの FITC-CD86、および M2 マクロファージマーカーの PE-CD206 抗体を添加し、4%パラホルムアルデヒドで固定化し洗浄後、BD FACSAria Fusion フローサイトメーターを用いて分析した。

### 結果および考察

#### 1. ナノキャリアの物性とレセプターとの親和性評価

原料となる二重鎖を有する脂質分子を適当な比率で混合し、脂質薄膜法に超音波照射を組み合わせた方法でナノキャリアを作製した。体内に投与された薬物はそのサイズによって滞留性が異なることが知られている。例えば 5 nm 以下の小さな分子は腎臓から尿として排出されたり、血管壁から漏出されたりする。逆に、200 nm 以上の大きな粒子となると網内系に異物として認識され排除される。したがって、一般的に 50~200 nm にサイズ制御できれば血中安定性が向上すると示されている。我々が作製したナノキャリアはまさにこの範囲に相当する DDS キャリアであることが確認できた。

さらに作製したナノキャリアの標的受容体への親和性を評価した。センサー表面に固定化した標的受容体と溶液中のナノキャリアとの結合をバイオレイヤー干渉法 (BLI) によって測定し、その親和性を定量化した結果、ナノキャリアは、リポソーム表面への固定化の影響もなくその受容体に対して極めて高い親和性を維持していることを確認した (KD=7.7 nM)。

#### 2. マウス骨髄由来マクロファージ (BMDM) を用いたナノキャリアによるサイトカイン産生の制御

マウス骨髄から採取したマクロファージを初代培養しその培地に適量の LPS を加えた。その 1 時間後、所定の濃度のナノキャリアを添加し、さらに 4 時間後に培地中のサイトカイン産生量を ELISA 測定した (図 1)。この結果、LPS 添加後、TNF $\alpha$ 、IL-6、CCL2、CCL5 といった炎症性のサイトカイン・ケモカインはいずれも上昇したが、ナノキャリアの添加によりその産生量は急激に低下したことが確認できた。これは先に示したナノキャリアの標的受容体への親和性が維持されていることと矛盾しない。

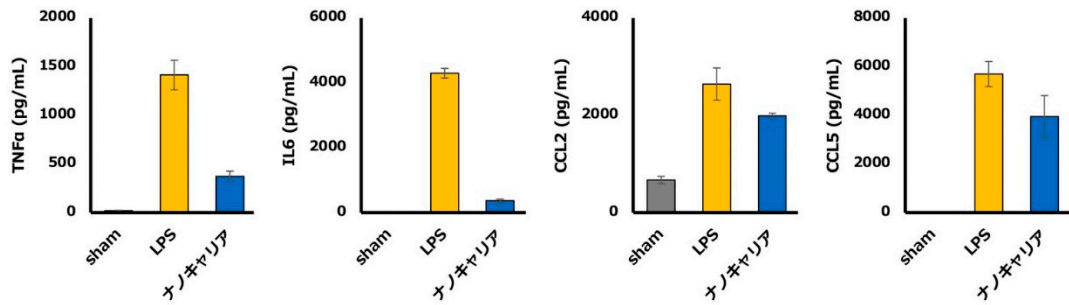


図 1. マウス骨髄由来マクロファージにおけるナノキャリアの抗炎症効果  
LPS 添加前後における BMDM の培養液中のサイトカイン・ケモカイン量を市販の ELISA キットにより定量した。

### 3. ナノキャリアによるサイトカインストームの制御と ARDS モデルマウスに対する治療効果

LPS の経鼻投与によって作製した ARDS モデルに、蛍光ラベル化したナノキャリアを経鼻投与した。24 時間後にサクリファイスし、摘出した各臓器を蛍光イメージャーによって評価したところ、ほぼすべてのナノキャリアが肺に集積していることを確認した (図 2A)。そこで肺の新鮮凍結切片を作製し、免疫染色によってナノキャリアの局在を評価した。共焦点蛍光顕微鏡によって観察したところ、マクロファージのマーカーとして知られる CD68 陽性細胞とナノキャリアの局在が一致した (図 2B)。これらの結果は、受容体を介してナノキャリアがマクロファージに特異的に取り込まれたことを示唆している。

次に、PS ナノキャリアによる ARDS モデルの治療効果を評価した。マウスに LPS 投与後、PS ナノキャリアを 1 日 3 回経鼻投与し、3 日後に BALF を回収した。この BALF から遠心分離によって細胞を回収し、上清画分はサイトカインの解析に用いた。また肺組織サンプルはパラフィン包埋して切片化し病理診断を行った (図 3)。この結果、PBS を投与した対照群では CT 画像に広範囲なコンソリデーションを呈し、病理診断においても著しい肺胞の虚脱が認められたのに対し、PS ナノキャリア投与群では肺胞が広がり、十分なガス交換を行えるだけの肺胞換気量が得られていることが確認できた。さらに BALF 中の好中球・マクロファージの数はナノキャリア投与により減少し、同時に BALF 中の炎症性サイトカイン、炎症性ケモカインの大幅な減少と抗炎症性サイトカイン IL-10 の上昇が観察された (図 4)。

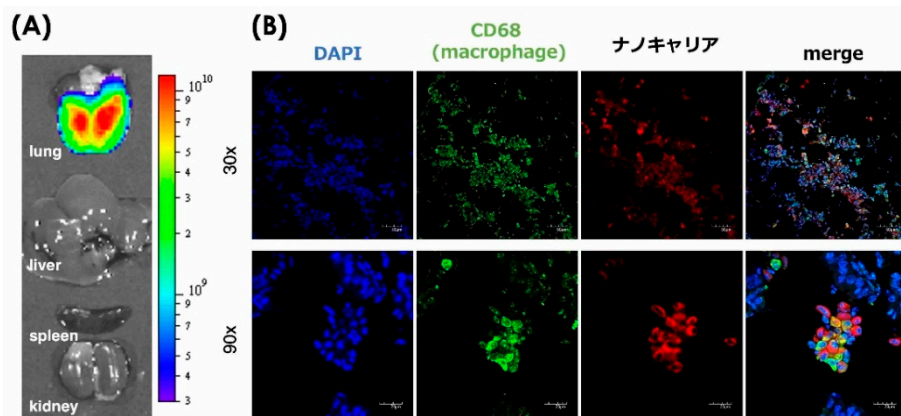


図 2. ナノキャリアの ARDS モデルでの体内動態とマクロファージへの集積  
A) ARDS モデルに蛍光ラベル化ナノキャリアを両鼻腔から投与した。24 時間後にサクリファイスし、摘出した各臓器を蛍光イメージャーによって評価した。  
B) 肺の新鮮凍結切片を作製し、免疫染色によってナノキャリアの局在を評価した。

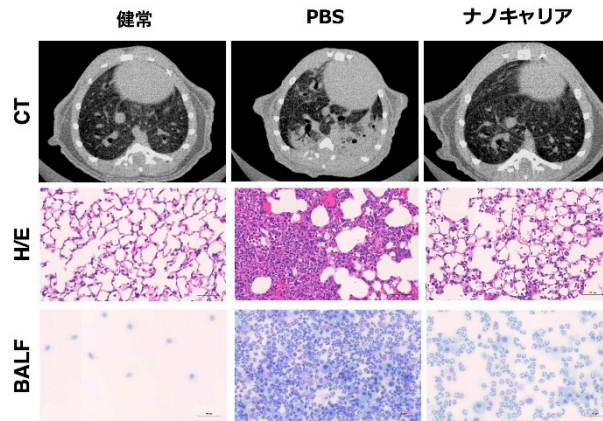


図 3. ARDS モデルにおけるナノキャリアによる組織修復

ARDS モデルにナノキャリアを 5 mg/mL を 1 日 3 回経鼻投与し、3 日後に CT 撮影した。サクリファイスの後、摘出した各臓器を組織化学的に評価した。

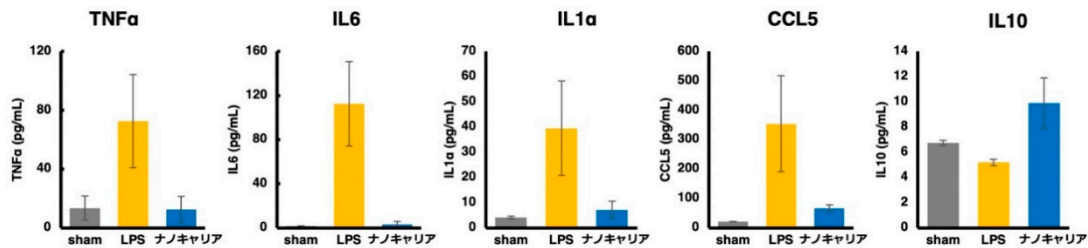


図 4. ARDS モデルにおけるナノキャリアによる組織修復

BALF 中のサイトカイン・ケモカイン量を市販の ELISA キットにより定量した。

#### 4. ナノキャリアによる肺胞マクロファージの表現系スイッチング

ナノキャリアによる ARDS モデルマウスに対する治療効果の機序を明らかにするために、BALF 中の肺胞マクロファージの極性を評価した [3~5]。代表的なマクロファージマーカーである抗 CD11b 抗体、抗 F4/80 抗体、そして M1 マクロファージマーカーの抗 CD86 抗体、および M2 マクロファージマーカーの抗 CD206 抗体を添加し、4%パラホルムアルデヒドで固定化し洗浄後、フローサイトメーターで測定した。抗 CD11b 抗体および抗 F4/80 抗体に対してダブルポジティブな母集団においてゲーティングし、M1 および M2 マクロファージのポピュレーションを解析した。この結果、PBS 投与群ではマクロファージはほぼ完全に炎症性 M1 マクロファージに分極していた。これに対してナノキャリア投与群では M1 マクロファージは大きく減少し、それに代わって組織修復性の M2 マクロファージのポピュレーションが大幅に増えていることが明らかとなった。この結果、マクロファージの二つのサブタイプの比率 (M2/M1) は、ナノキャリア投与群では 0.79 となった (図 5)。M2 マクロファージの誘導によって抗炎症性メディエーターの産生による組織損傷反応の終息と、その後引き続き組織修復が開始されることが知られている。それに関連する代表的な抗炎症性サイトカインである IL-10 が BALF 中において高濃度で検出されたことや、組織の修復や体重の回復が確認されたことは、ナノキャリアの投与による M2 マクロファージの著しい増加と関連している可能性が示された。

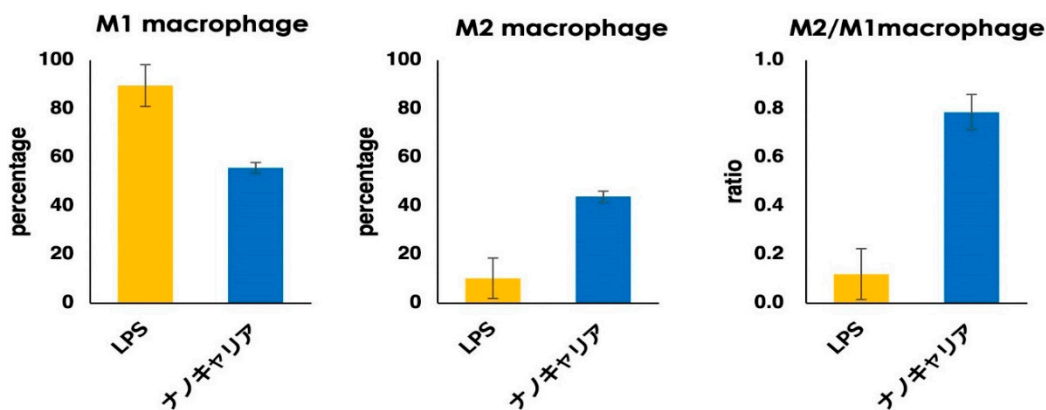


図5. ARDS モデルにおけるナノキャリアによる組織修復

BALF 中のマクロファージ表現系をフローサイトメーターで定量化し、ナノキャリア投与前後での M2/M1 比を算出した。

### 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立研究開発法人産業技術総合研究所生命工学領域の戸井田力上級主任研究員、国立研究開発法人国立循環器病研究センター研究所の姜貞勲室長、九州大学大学院医学研究院救命医学講座の赤星朋比古教授、ならびに九州大学先端医療オープンイノベーションセンターの河野喬仁特任講師である。

### 文献

- 1) Fei Zhou, Ting Yu, Ronghui Du, Guohui Fan, Ying Liu, Zhibo Liu, Jie Xiang, Yeming Wang, Bin Song, Xiaoying Gu, Lulu Guan, Yuan Wei, Hui Li, Xudong Wu, Jiuyang Xu, Shengjin Tu, Yi Zhang, Hua Chen, Bin Cao. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *LANCET*. 2020 MARCH 28; 395: 1054-1062. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
- 2) Eddy Fan, Jeremy R Beitler, Laurent Brochard, Carolyn S Calfee, Niall D Ferguson, Arthur S Slutsky, Daniel Brodie. COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: is a different approach to management warranted? *LANCET*. 2020 July 06; 395: 1054-1062, DOI: [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30304-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30304-0)
- 3) Li C, Qin T, Zhao J, He R, Wen H, Duan C, Lu H, Cao Y and Hu J. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome-Educated Macrophages Promote Functional Healing After Spinal Cord Injury. *Front. Cell. Neurosci.* 2021 September 28; 15:725573. DOI: 10.3389/fncel.2021.725573
- 4) Lu Wang, Huasheng Zhang, Liya Sun, Wei Gao, Ye Xiong, Aying Ma, Xiali Liu, Lei Shen, Qiang Li & Hong Yang. Manipulation of macrophage polarization by peptide-coated gold nanoparticles and its protective effects on acute lung injury. *Journal of Nanobiotechnology*. 2020 February 26; 18, DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00593-7>
- 5) Jiyeon Park, Seung Woo Choi, Bong Geun Cha, Jaeyun Kim, and Suk-Jo Kang. Alternative Activation of Macrophages through Interleukin-13-Loaded Extra-Large-Pore Mesoporous Silica Nanoparticles Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2021 August 26; 7 (9): 4446-4453. DOI: 10.1021/acsbomaterials.1c00946