

100. 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

河野 裕允

立命館大学 薬学部 分子薬物動態学研究室

Key words : マクロファージ, 磁場

緒言

炎症性腸疾患 (Inflammatory Bowel Disease: IBD) は、小腸および大腸に慢性的に炎症をきたす疾患の総称であり、厚生労働省より特定疾患 (難病) に指定されている。IBD の発症メカニズムは未だ未解明であるため、根治療法が存在せず、IBD 患者は対症療法としてステロイドや免疫抑制薬などの長期投与が余儀なくされている。このように、IBD は治療満足度の低い疾患であり、効果的な新規治療法の開発が強く望まれている。

IBD の発症・進行には、腸管内に存在するマクロファージが重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている¹⁾。特に、抗炎症作用を有する M2 型マクロファージは、消化管における炎症を著しく抑制することが知られている²⁾。そのため、体外より M2 型マクロファージを消化管炎症部位へ選択的かつ効率的に送達することが可能となれば、画期的な IBD 治療法の構築につながる事が期待できる。さらに、送達する M2 型マクロファージに抗炎症性サイトカインをコードしたプラスミド DNA を導入しておくことにより、本細胞治療法による IBD 治療効果をさらに向上することが可能である。

そこで本研究では、マクロファージを標的部位へ選択的に送達するシステムの開発を目的として、「磁場」に着目し、磁場応答性を有するマクロファージの作製、およびその機能評価を行った。

方法、結果および考察

1. マクロファージに対するマグネタイトおよびプラスミド DNA の同時導入法の開発

マクロファージに対して磁性体 (マグネタイト) とプラスミド DNA を同時に導入するため、マグネタイト内封カチオン性リポソーム/プラスミド DNA 複合体 (マグネタイト内封リポプレックス) の作製を行った。まず、カチオン性脂質である DOTAP とコレステロールより成るマグネタイト内封カチオン性リポソームを調製し、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 に対する毒性を評価した。リポソームを RAW264 細胞に添加後、磁場存在下において一定時間培養した結果、顕著に高い細胞毒性が認められた。これは、DOTAP の有する正電荷と細胞膜との間で生じる静電的な相互作用に起因するものと推察される。そこで、DOTAP、コレステロールに加え、中性脂質である DSPC を一定比率で混合したマグネタイト内封カチオン性リポソームを新たに調製し、細胞毒性評価を行った。その結果、DSPC を任意の割合で混合したリポソームは毒性をほとんど示さなかった (Fig.1A)。そこで、リポソームの組成を DOTAP: DSPC: Cholesterol = 4:1:5 (mol) に決定し、このリポソームの表面にプラスミド DNA を静電的相互作用により結合させた複合体を作製した。本複合体による遺伝子導入効率を評価した結果、磁場付加時間依存的に遺伝子発現効率が增大することが明らかとなった (Fig.1B)。その一方で、細胞毒性も磁場付加時間依存的に増大していることから (Fig. 1C)、以降の検討では、細胞毒性が低く、高い遺伝子導入効率を得られた条件 (リポソーム添加量: 10 μ g、磁場付加時間: 10 min) において RAW264 細胞に対するマグネタイトおよびプラスミド DNA の導入を行うこととした。

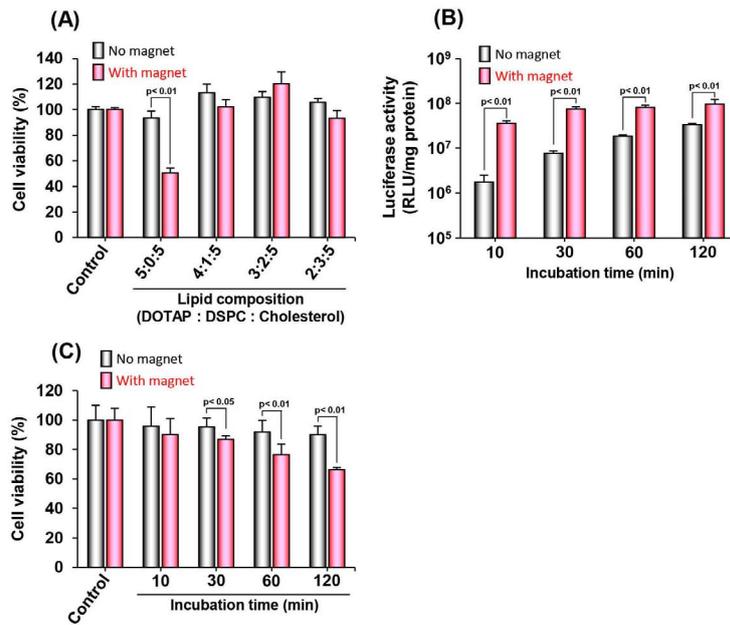


Fig. 1. Optimization of lipid composition of magnetic lipoplexes and incubation time.

(A) Cell viability at 24 h after incubation with magnetic lipoplexes composed of several lipid ratio. Luciferase expression levels (B) and cell viability (C) at 24 h after incubation with magnetic lipoplexes (DOTAP: DSPC: Chol = 4:1:5 mol). Each value represents the mean + S.D. (n=4). Two-group comparisons were performed with a student's t test.

2. マグネタイト導入マクロファージの免疫応答の評価

マグネタイトおよびプラスミド DNA を導入したことによる RAW264 細胞の免疫応答の変化を評価するため、リポポリサッカライド (LPS) 刺激下におけるマグネタイト導入マクロファージの一酸化窒素、およびサイトカイン産生量を測定した。その結果、マグネタイト内封リポプレックスの導入により、RAW264 細胞より産生される一酸化窒素量が有意に増大することが示された (Fig.2A)。鉄は一酸化窒素合成酵素の発現を転写レベルで促進することが報告されていることから³⁾、本検討においても、マグネタイトの導入により RAW264 細胞における一酸化窒素合成酵素の発現が亢進した結果、LPS 存在下における一酸化窒素産生量が増大したものと推察される。一方、炎症性サイトカインである IL-12、TNF- α 、および抗炎症性サイトカインの IL-10 においては、いずれもマグネタイト内封リポプレックスの導入に伴う産生量の変化は認められなかった (Figs.2B-D)。本結果より、マグネタイト、およびプラスミド DNA の導入に伴う RAW264 細胞の免疫活性の低下は認められず、マグネタイト導入 RAW264 細胞が IBD に対する細胞治療法に応用可能であることが示された。

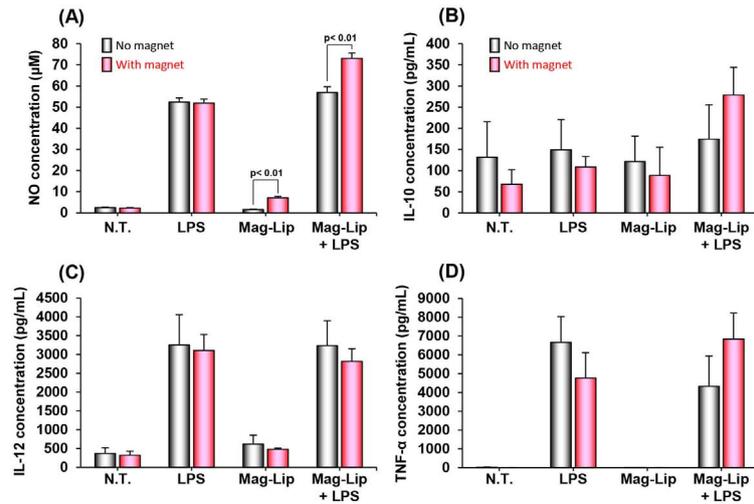


Fig. 2. Effect of introduction of magnetic lipoplexes on production of nitric oxide (A), IL-10 (B), IL-12 (C), and TNF- α (D) from lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells.

Each value represents the mean + S.D. (n=4). Two-group comparisons were performed with a student's t test.

3. マグネタイト導入マクロファージの *in vitro* 接着効率の評価

マグネタイトの導入により RAW264 細胞が磁場付加部位へ効率的に接着することを証明するため、マグネタイト導入 RAW264 細胞の Caco-2 細胞単層膜に対する接着効率の評価を行った。マグネタイトおよびプラスミド DNA を導入した RAW264 細胞を Calcein-AM により蛍光標識し、Caco-2 細胞単層膜上に添加後、磁場付加を施した。その結果、磁場を付加した場合に、マグネタイト導入 RAW264 細胞の接着数が顕著に増大することが明らかとなった (Fig. 3)。

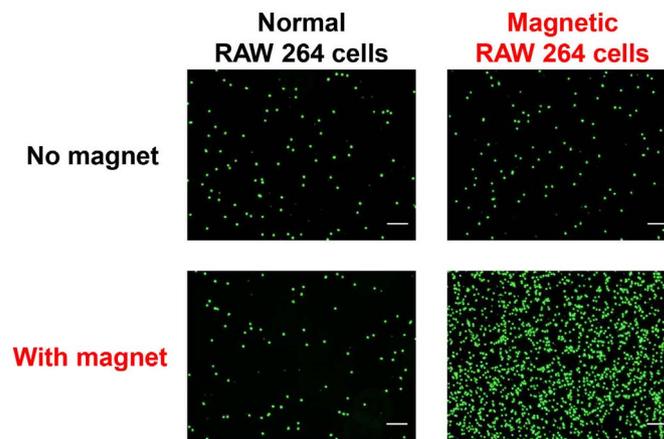


Fig. 3. Adhesion of magnetic lipoplexes-introduced RAW 264 cells to Caco-2 cells monolayer.

Magnetic lipoplexes-introduced RAW 264 cells were labeled by Calcein-AM. These cells were incubated with Caco-2 cells monolayer for 5 min under magnetic field. The adhesion of RAW 264 cells to Caco-2 cells monolayer was observed using fluorescence microscopy. Scale bar: 200 μ m.

4. マグネタイト導入マクロファージのマウス大腸に対する接着効率の評価

最後に、マウス大腸におけるマグネタイト導入 RAW264 細胞の接着効率について評価した。蛍光標識したマグネタイト導入 RAW264 細胞をマウス直腸内に投与し、大腸に対して磁場を付加した後、大腸内の蛍光強度を測定した。その結果、マグネタイト導入 RAW264 細胞に由来する蛍光強度は、磁場を付加した大腸において顕著に高い値を示した (Fig.4)。

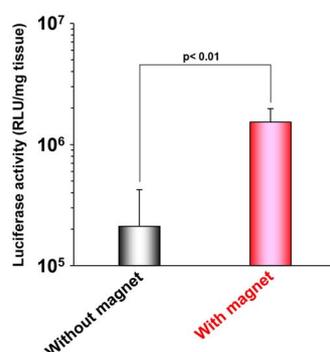


Fig. 4. Adhesion of magnetic lipoplexes-introduced RAW 264 cells to colon tissue in mice.

Magnetic lipoplexes-introduced RAW 264 cells were injected intrarectally into mice, and exposed 5 min under magnetic field. The adhesion of RAW 264 cells to colon tissue was evaluated by luciferase assay. Two-group comparison was performed with a student's t test.

以上、本研究では、マグネタイト内封カチオン性リポソームを利用することで、マクロファージに対して短時間かつ高効率にマグネタイトおよびプラスミド DNA を導入することに成功した。また、マグネタイト導入マクロファージと外部磁場の併用により、大腸組織に対して効率的にマクロファージを送達できることを示した。現在、マグネタイト導入マクロファージを IL-4、13 およびそのプラスミド DNA を用いて M2 型に分化誘導し、本細胞による大腸炎治療効果について IBD モデルマウスを用いて検討している。

最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Heinsbroek SE, Gordon S. The role of macrophages in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Mol Med.* 2009;11:e14. doi: 10.1017/S1462399409001069. PubMed PMID: 19439108.
- 2) Hunter MM, Wang A, Parhar KS, Johnston MJ, Van Rooijen N, Beck PL, McKay DM. In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology.* 2010;138(4):1395-1405. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.041. PubMed PMID: 20044996.
- 3) Hida AI, Kawabata T, Minamiyama Y, Mizote A, Okada S. Saccharated colloidal iron enhances lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(11):1426-1434. PubMed PMID: 12757853.