

163. Nano-lipogel を用いた T 細胞特異的な低分子化合物の開発

古賀 智裕

*長崎大学病院 医療教育開発センター（第一内科）

Key words : 全身性エリテマトーデス, ナノリポジェル, T 細胞標的療法, Drug delivery system

緒言

全身性エリテマトーデス (SLE) は抗 ds DNA 抗体などの免疫複合体の組織沈着により起こる全身性炎症性病変を特徴とする自己免疫疾患であるが、病因に関する詳細な分子機構はまだ明らかでない。現在、有効性が確立された SLE に対する治療はステロイドや免疫抑制剤の全身投与であり、近年、次世代の治療として B 細胞阻害療法等の生物学的製剤を用いた臨床試験が実施されているが、現時点で SLE に有効なステロイドを超える薬剤はなく、日常診療におけるステロイドや免疫抑制剤の長期に渡る全身投与における有害事象に関する問題は未解決のままである。

SLE は、T 細胞の機能異常が発症とその病態形成に大きく関わっていることが知られており、私たちは SLE 患者の血清中の抗 CD3/TCR 抗体が calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMK4) を核内に誘導し、IL-2 の産生を抑制していることを報告した¹⁾。

CaMK4 は T 細胞の Th17 分化シグナルや制御性 T 細胞の機能に関連しており、SLE の治療標的となりうるが、臨床応用に際し目的の組織のみに到達する delivery system を構築する必要がある。nanoscale liposomal polymeric gels である nanolipogel (nLG) を用いた CaMK4 阻害剤 (KN-93) における CD4 陽性 T 細胞への供給システムの開発を試み、動物モデルでその効果を検討した。

方法

KN-93 内包 nLG の *in vitro* における細胞標的能を評価するために、CD4 標識 nLG と CD8 標識 nLG の両者を作製し、細胞増殖における影響を検討した。

KN-93 内包 nLG の生体内分布を確認するために蛍光色素 (ATTO590) で標識した nLG をマウスに腹腔内投与を行い、投与後 2 時間の脾臓を採取し、フローサイトメトリーと蛍光顕微鏡にて分布を評価した。

これまでの検討により、私たちは MRL/*lpr* マウスに KN-93 を全身投与し加療する場合、少なくとも $240 \mu\text{g}/\text{mouse}/\text{week}$ の KN-93 が必要なことがわかった²⁾。そこで、nLG に各種濃度の KN-93 を結合させ、MRL/*lpr* マウスに対して、抗体で標識されていない KN-93 が内包された nLG (Free nLG-KN93) と、各種抗体で標識された KN-93 含有 nLG (CD4 nLG-KN93) と、KN-93 が内包されていない nLG (Free nLG-empty, CD4 nLG-empty) を週 1 回、腹腔内投与し、薬剤の有効性を週齢 16 の時点での臨床所見 (皮膚所見、蛋白尿)、免疫組織学的所見 (腎臓)、血清学的所見 (抗 dsDNA 抗体)、血清サイトカイン (IL-2 と IL-17)、T 細胞サブセット解析、T 細胞の機能により評価した。

結果

KN-93 が nLG に内包されていることを電子顕微鏡で確認し (図 1A、B)、細胞増殖アッセイにて CD4 が標的となることを *in vitro* で確認した (図 1C、D)。抗 CD4 抗体で標識した nLG が組織 (脾臓) に到達していることを確認した (図 1E)。フローサイトメトリーの解析にて、CD4 標識 nLG は CD19 陽性細胞には結合しておらず、CD8 陰性 CD90.2 陽性 T 細胞に結合していることが確認された (図 1F)。

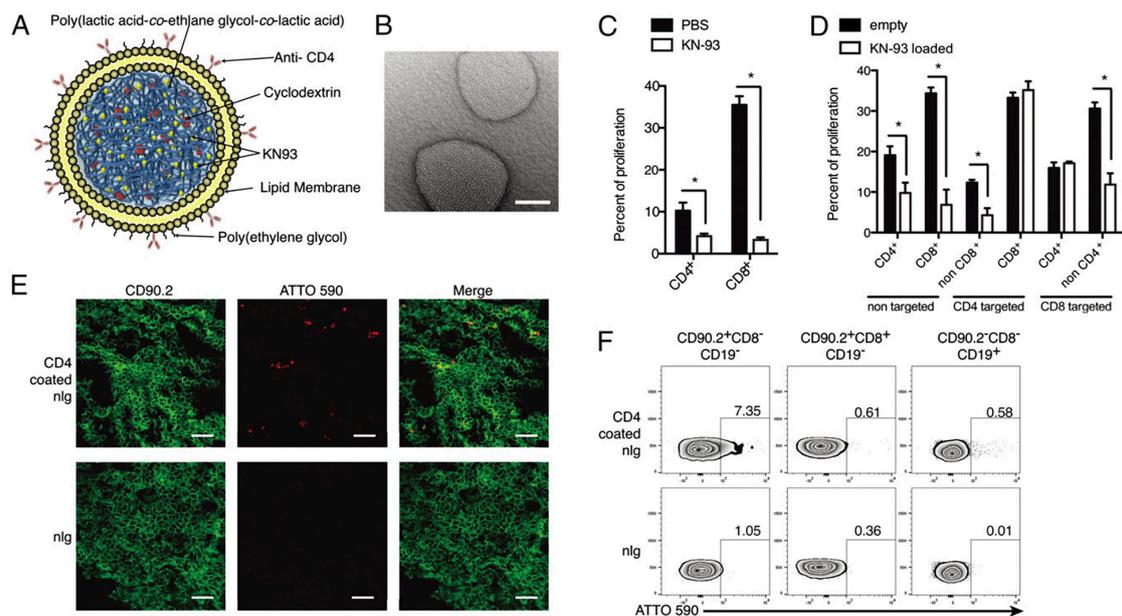


図 1. KN-93 内包ナノリポジェルの特徴

(A) 本研究で使用した KN93 搭載の nlg の構造のスキーマ。nlg はその表面にストレプトアビジンを含み、各実験において注入の直前にビオチンと結合した抗 CD4 抗体で被覆した。(B) nlg の走査型電子顕微鏡像。スケールバー：100 nm。nlg の平均直径は 214.1 ± 87.3 nm であった。(C および D) KN93 をロードした nlg の標的的能力を解明するための増殖アッセイ。B6 マウスからの T 細胞を CFSE で標識し、遊離 KN93 (C) または抗 CD4 または CD8 抗体で被覆した KN93 nlg (D) のいずれかで処置した。細胞をプレートに結合した抗 CD3 および CD28 抗体の存在下で 72 時間刺激し、続いてフローサイトメトリーにより T 細胞の増殖を測定した。データは 3 つの独立した実験の代表例である。エラーバーは平均 SEM を表す。*p 値は不一致スチューデント t 検定による 0.05 未満。(E および F) 抗 CD4 抗体で被覆した nlg-ATTO 590 で処理した MRL/lpr マウス (12 週齢雌) の免疫細胞化学およびフローサイトメトリー分析。これらの実験の nlg は、ATTO 590 色素を負荷することによって作製し腹腔内注射を行った。(E) CD90.2 発現は緑色であり、ATTO590 は赤色で nlg をロードした。上のパネルは、抗 CD4 抗体でコートされた nlg で処置したマウスの脾臓を示し、下のパネルは、非コート nlg で処置したマウスを示す。スケールバー：20 μ m。(F) 各処置マウスの脾臓由来の CD8 陰性 T 細胞 (CD90.2 陽性 CD19 陰性) または B 細胞 (CD90.2 陰性 CD19 陽性) をフローサイトメトリーで分析した。パネル中の数字は、各群における ATTO590 発現細胞の頻度を表す。

SLE のモデルマウスを用いた実験において、抗 CD4 抗体で標識された KN-93 内包 nLG (CD4-KN93 nLG) は、マウスの皮膚炎の改善 (図 2A) と蛋白尿の改善 (図 2B) を認めたが、自己抗体の産生に変化はなかった (図 2C)。CD4-KN93 nLG の投与にて第 16 週齢における血清中の IL-2 の増加と IL-17A の減少を認めた (図 2D、E)。また組織 (腎臓、脾臓) における IL-17 産生 CD4 陽性 T 細胞の割合を減少させた (図 2F)。腎臓組織の評価にて、CD4-KN-93 nLG の投与にて PAS 染色における糸球体病変の改善と蛍光染色による C3 の糸球体の沈着の減少 (図 2H、J) に加え腎臓に浸潤している T 細胞の数を減少させた (図 2I)。

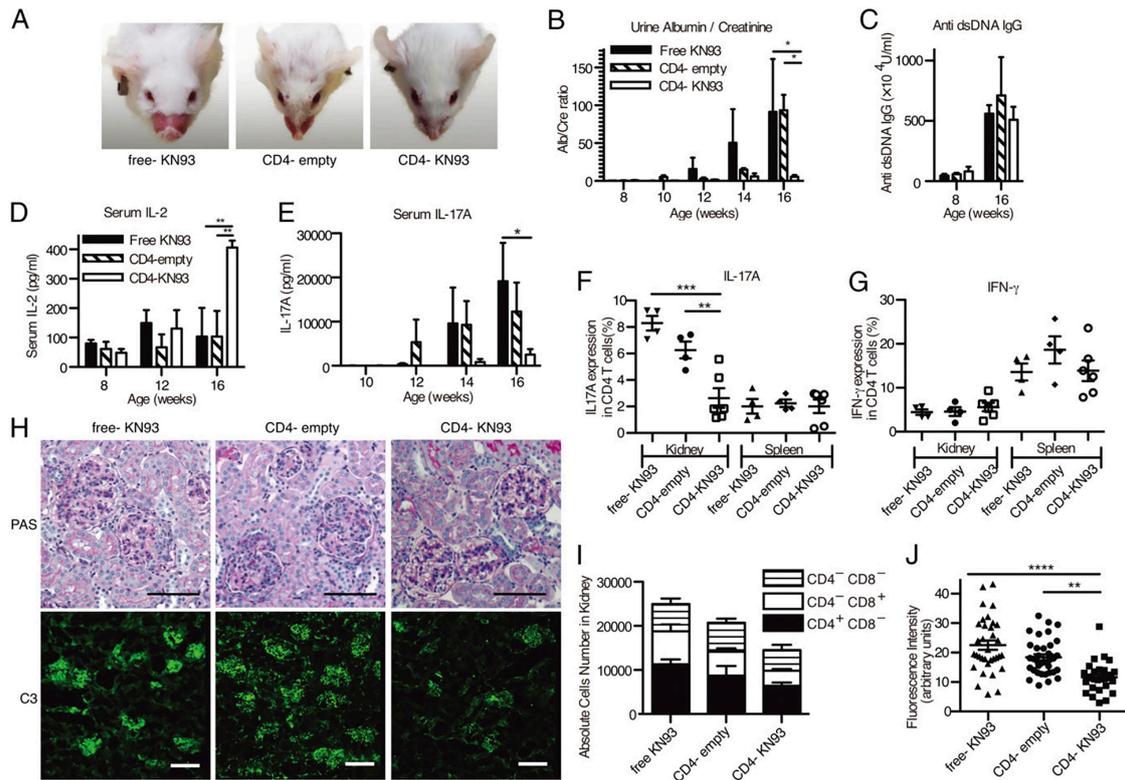


図2. 抗CD4抗体被覆nlG-KN93は、MRL/lprマウスの疾患進行を抑制する

(A) 遊離 KN93 (free-KN93)、抗 CD4 抗体でコーティングされた nlG 内包なし (CD4-empty) および CD4-nlg KN-93 内包あり (CD4-KN93) で処置したマウス (16 週齢) からの顔面皮膚の代表的画像。治療は 8 週齢から 16 週齢まで (腹腔内注射; 合計 8 回) 行った。(B) 各処置群のマウスからの尿アルブミンおよびクレアチニンの平均比。尿試料を隔週で採取し、アルブミンおよびクレアチニン ELISA によって測定した。(C-E) 各群の血清中の抗 dsDNA 抗体 (C)、IL-2 (D)、または IL-17A (E) の平均力価を ELISA によって測定した。(F および G) 細胞内サイトカイン染色を用いたフローサイトメトリーによる腎臓または脾臓における IL-17A 産生 (F) および IFN- γ 産生 (G) CD4 陽性 T 細胞の頻度。(H) 各処置の 16 週齢の MRL/lpr マウス由来の糸球体領域の代表的な画像。PAS 染色は上のパネルに示され、C3 の沈着は免疫蛍光によって検出され、下のパネルに示されている。スケールバー: 100 μ m。(I) 16 週齢の示された処置群からの腎臓における浸潤 T リンパ球の累積数。各 T リンパ球の数は、CD4 陽性 CD8 陰性、CD4 陰性 CD8 陽性および CD4 陰性 CD8 陰性 T 細胞の 3 つのグループに分けられる。(J) 示された処置群のマウスからの糸球体で測定された C3 沈着の蛍光強度。(B-E) および (I) 3 つの独立した実験の代表的なデータ (n = 4-6 マウス群) が示されており、エラーバーは平均 SEM を表す。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001。統計手法は two-way ANOVA with a Bonferroni posttest (B, D, E, F) もしくは one-way ANOVA (F, J) を使用した。

考 察

SLE における病態形成における T 細胞の機能、T 細胞分化シグナルの重要性が明らかとなり治療への応用が期待されているが、現時点で既存のステロイドや免疫抑制剤を超える治療薬はない。CaMK4 は SLE の T 細胞において発現とその機能が亢進し SLE の病態への関与が示唆されており、私たちは CaMK4 の阻害が Th17 細胞への分化を制御す

ることを動物モデルで明らかにした³⁾。しかし、CaMK4 阻害剤の全身投与におけるリスクや脳・性腺への影響に対しては不明な点が多く、ヒトへの応用は現段階で現実的ではない。

SLE を含めた自己免疫疾患の現在の治療は、コルチコステロイドおよび細胞傷害性薬物の全身投与であり、有害事象が問題となる。低分子化合物の薬物の開発において、疾患の病因に関与する分子以外を標的とするオフターゲット効果が問題となる。

この研究では、SLE 患者および SLE マウスにおける IL-17 産生を促進することされる CaMK4 を、nLG を用いることで、CD4 陽性細胞においてのみ選択的に阻害した。免疫抑制を達成するために必要な nLG に内包された KN-93 の量は、全身投与のモデルの KN93 用量のわずか 10%であった。

本研究に記載されているナノ粒子系は、放出された薬物の局在化による局所での高濃度を達成することが可能である。以前の *in silico* モデルを用いたナノ粒子のプロファイルを検討した研究では⁴⁾、カプセル化された薬物が、標的内の全身自由投与量を数桁上回り、標的へのナノ粒子の近接度に依存して蓄積することが示された。このような標的送達システムは、ヒトに使用される場合、これらの薬物に関連する副作用プロファイルを有意に抑制し、効力の増加に加えて患者の生活の質を改善することができる。従って、nLG 系を用いた低分子阻害剤は、慢性自己免疫状態の治療を改善するための有望なアプローチであると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、米国ハーバード医科大学ベスイスラエルディーコネスメディカルセンターリウマチ科の犬友耕太郎、George C. Tsokos、米国エール大学免疫生物学の Tarek M. Fahmy である。

文 献

- 1) Koga T, Ichinose K, Mizui M, Crispín JC, Tsokos GC. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV suppresses IL-2 production and regulatory T cell activity in lupus. *J Immunol.* 2012 Oct 1;189(7):3490-6. PMID: 22942433
- 2) Koga T, Mizui M, Yoshida N, Otomo K, Lieberman LA, Crispín JC, Tsokos GC. KN-93, an inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV, promotes generation and function of Foxp3⁺ regulatory T cells in MRL/lpr mice. *Autoimmunity.* 2014 Nov;47(7):445-50. doi: 10.3109/08916934.2014.915954. PMID: 24829059
- 3) Koga T, Hedrich CM, Mizui M, Yoshida N, Otomo K, Lieberman LA, Rauen T, Crispín JC, Tsokos GC. CaMK4-dependent activation of AKT/mTOR and CREM- α underlies autoimmunity-associated Th17 imbalance. *J Clin Invest.* 2014 May;124(5):2234-45. doi: 10.1172/JCI73411. PMID: 24667640
- 4) Labowsky M, Lowenthal J, Fahmy TM. An in silico analysis of nanoparticle/cell diffusive transfer: application to nano-artificial antigen-presenting cell:T-cell interaction. *Nanomedicine.* 2015 May;11(4):1019-28. doi: 10.1016/j.nano.2014.12.019. PMID: 25652896