

AhR リガンドを用いた B 細胞特異的 DDS の開発

木村彰宏

国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 免疫病理部門

【研究の背景】

近年、ダイオキシン受容体として知られている AhR がさまざまな免疫応答を制御していることが報告されている。本申請者らはこれまでに AhR が Th17 細胞の分化に関与していること¹⁾、マクロファージにおいて LPS 誘導性の IL-6 産生を選択的に抑制していること²⁾、リステリア感染において感染防御に関与していること³⁾、AhR が NQO1 の発現誘導を介して自然免疫応答を抑制していること⁴⁾などを明らかにしてきた。

また、本申請者は AhR が、IL-10 を産生することで免疫応答を抑制する抑制性 B (B10) 細胞の分化に関与していることを発見した(未発表)。さらに AhR リガンドが B 細胞から産生される IL-10 産生を促進することも明らかにしている(未発表)。現在これら研究成果を基盤に、B 細胞特異的 AhR リガンドによる DDS の開発に取り組んでいる。

【目 的】

自己免疫疾患の多発性硬化症は中枢神経系の脱髄疾患の一つで、進行性の多発性硬化症に対しては根本的な治療法は存在しない。本申請者らはダイオキシン受容体として知られている Aryl hydrocarbon receptor (AhR) が免疫抑制に関与している抑制性 B 細胞の分化を誘導することで、多発性硬化症を抑制していることを発見した。本研究では B 細胞特異的に AhR リガンドを作用させる Drug delivery system (DDS) を開発することで、多発性硬化症に対する新規治療法の開発を目指す。

【方 法】

本申請者らは AhR リガンドとして知られている FICZ が B 細胞による IL-10 産生を促進する結果を得ている。そこでまず FICZ をリポソームに内包させ、FICZ のリポソーム化を行う。その後、リポソーム化 FICZ に B 細胞を特異的に認識する CD19 抗体を結合させる。これら一連の実験については市販のリポソームカプセル化キットを用いて行う。B 細胞特異的リポソーム化 FICZ が完成した後、まず脾臓細胞において B 細胞特異的リポソーム化 FICZ が B 細胞特異的に作用しているかをフローサイトメーターで確認するとともに、B 細胞による IL-10 産生の促進に関してもフローサイトメーターで検証する。以上の検証実験により、B 細胞特異的リポソーム化 FICZ による AhR リガンドの B 細胞特異的な送達および IL-10 産生の促進が確認された後、B 細胞特異的リポソーム化 FICZ を用いた自己免疫疾患の抑制効果を調べる。多発性硬化症のマウスモデルとして知られている Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) を誘導したマウスに B 細胞特異的リポソーム化 FICZ あるいはコントロールリポソームを投与して、EAE の臨床スコア、血中サイトカイン濃度、IL-17 産生性ヘルパー T (Th17) 細胞の浸潤等を比較する。また、in vivo においても B 細胞特異的リポソーム化 FICZ が B 細胞特異的に作用していることをフローサイトメーターで確認する。

【結 果】

本研究において、FICZ のリポソーム化が成功し、さらに FICZ を内包したリポソームに CD19 抗体を結合させることも完了

した。さらにこの B 細胞特異的リポソーム化 FICZ を脾臓細胞と培養したところ、B 細胞特異的リポソーム化 FICZ は B 細胞のみに取り込まれ、IL-10 産生を促進させることが明らかとなった。これらの結果から、本申請者らが開発した B 細胞特異的リポソーム化 FICZ は予想通りに機能していることが示された。現在、この B 細胞特異的リポソーム化 FICZ をマウス生体内に投与して、生体内においても B 細胞特異的にデリバリーされることを確認していくとともに、最終的には EAE に対する治療効果が認められるのかを確認中である。

一方で、本申請者らは制御性 B 細胞分化における AhR の作用機序に関しても解明を進めた。AhR 欠損 B 細胞では LPS 刺激による IL-10 産生がコントロール細胞より有意に減弱していることがこれまでの研究で明らかになっていた。AhR は Arnt と複合体を形成し転写因子として働くことが知られている。そこで AhR/Arnt 複合体が B 細胞における IL-10 産生に必要なことを確認するために、Arnt 欠損マウスおよび AhR/Arnt 二重欠損マウスを作製した。Arnt 欠損マウスは胎生致死のため、B 細胞特異的に欠損させたコンディショナル KO (cKO) マウスの作製が完了し解析を進めたところ、コントロール細胞に対して AhR 欠損あるいは Arnt 欠損 B 細胞において LPS による IL-10 産生が有意に減少していることが判明した。さらに、AhR/Arnt 二重欠損 B 細胞においては単独欠損 B 細胞よりもより IL-10 産生が抑制されていた。これらの結果から、Breg 細胞分化は AhR と Arnt により協調的に制御されていることが示された。

【考 察】

本研究において、B 細胞特異的リポソーム化 FICZ が完成したことは非常に大きな進歩であると思われる。最終的には EAE などの自己免疫疾患に対する治療効果を確認する必要があるが、今回本申請者らが開発した B 細胞特異的リポソーム化 FICZ は AhR を標的とした治療における問題点を解決し画期的な治療法になる可能性を秘めていると思われる。

また、制御性 B 細胞における AhR の作用機序に関しても解明が進み、基礎研究の観点からも本研究は大きな進展があったと考えられる。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで AhR が免疫応答をはじめとするさまざまな生体反応に関与していることが報告されてきたが、その AhR の多岐にわたる機能が AhR をターゲットとした治療法の開発の障害となってきた。本研究において開発された B 細胞特異的リポソーム化 FICZ は、AhR リガンドが B 細胞以外の細胞に作用せずに副作用のない多発性硬化症に対する新規治療法の開発につながる事が可能となり、AhR を標的とした画期的な治療法になることが期待される。

【参考・引用文献】

- 1) [Kimura A](#), Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9721-9726, 2008.
- 2) [Kimura A](#), Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J Exp Med* 206: 2027-2035, 2009.
- 3) [Kimura A](#), Abe H, Tsuruta S, Chiba S, Fujii-Kuriyama Y, Sekiya T, Morita R, Yoshimura A. Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. *Int Immunol* 26: 209-220, 2014.
- 4) [Kimura A](#), Kitajima M, Nishida K, Serada S, Fujimoto M, Naka T, Fujii-Kuriyama Y, Sakamoto S, Ito T, Handa H, Tanaka T, Yoshimura A, Suzuki H. NQO1 inhibits the TLR-dependent production of selective cytokines by promoting I κ B- ζ degradation. *J Exp Med*. 215: 2197-2209, 2018.