



免疫疾患治療のための新たなDDS創薬

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-01-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 清水, 広介 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/00003933

免疫疾患治療のための新たな DDS 創薬

浜松医科大学 光先端医学教育研究センター フォトニクス医学研究部 分子病態イメージング研究室

清水広介

New targeting DDS for the treatment of immune diseases

Department of Molecular Imaging, Institute for Medical Photonics Research, Preeminent Medical Photonics Education & Research Center, Hamamatsu University School of Medicine

Kosuke Shimizu

Summary

As drug delivery system (DDS) is a powerful tool to improve pharmaceutical properties and further therapeutic effect of ingredients, application of the DDS technology to functionalized drug development is recommended. Immune diseases develop due to abnormal immune response to immune antigens in the body and chemotherapeutic treatments suppressing whole-body immune response by using such steroids and immunosuppressive drugs are applied to them, however they often show side effects including infectious disease onset because of their non-specific immune suppressive effect. In this review, I introduce a new targeting DDS enables the delivery of a drug to antigen-recognizing immune cells with antigen-modified liposomes for the treatment of immune diseases and recent research data of their therapeutic effects on allergy and multiple sclerosis.

はじめに

薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) は、薬が効果を発揮するのに必要な量および十分な時間となるように、目的とする部位へ的確に送達するための製剤技術であり、薬の有効性、安全性、使用性の向上に大きく貢献できるため、創薬における重要なオプションの一つとなっている。一口に DDS といっても実際には様々な種類があるが、抗体などの機能性分子を利用した標的化 DDS が最もイメージしやすい形と言っても良く、そのための多種多様な薬物キャリアの開発が進んでいる。筆者は 20 年以上一貫して、リポソームを主とする脂質ナノ粒子を用いた DDS 研究を続けており、難治性疾患の診断、治療のための製剤技術開発を行ってきた¹⁾。特にリポソーム表面に抗体やペプチド等の機能性分子を修飾した標的化リポソームによるがん治療²⁾、がん診断³⁾、脳梗塞治療⁴⁾、動脈硬化診断⁵⁾など、その汎用性を生かした検討を行い、主

作用の増強や副作用軽減、疾患部位の検出など、薬物が持つ本来の作用を最大限生かすための技術開発を進めてきた。近年では特に免疫疾患に焦点を絞り、独自に開発した新たな標的化 DDS を利用した治療法の開発を行っている。本稿では、その技術と最近のデータを紹介したい。

1. 免疫疾患治療への DDS の利用

免疫疾患はアレルギー疾患や自己免疫疾患に代表されるように、本来は自己・非自己の認識を介して生体防御の役割を担う免疫が、免疫抗原に対して異常・過剰に反応することで生体に悪影響が生じる疾患であり、その原因や発症・進行機構、程度、症状は様々であるが、基本的には免疫機構における促進系または抑制系の制御異常が原因で引き起こされる。免疫疾患に対する治療としては、症状の発症の原因となるケミカルメディエーターの機能を抑えるような抗アレルギー薬やステロイド系抗炎症薬、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の使用、また重篤な疾患の場合には免疫抑制剤や疾患修飾薬の投与など、対象となる免疫疾患の症状や原因に対して適用可能な薬物を選択して使用する薬物療法が一般的である。免疫疾患治療における DDS の利用としては、薬物の有効血中濃度を維持するための長期血中滞留性や徐放性付与、炎症部位への薬物送達を目的とした薬物封入型 DDS 製剤の開発が主に行われており、その利用により治療効果の持続に基づく投与回数の減少や投与量の減少による副作用軽減を達成している⁶⁾。また薬物キャリアが有する薬物保持性を利用し、薬物キャリアに封入された免疫抗原を投与して、免疫寛容を誘導するようなワクチン製剤の開発についても検討が進められている⁷⁾。このように免疫疾患治療においても DDS は、患者の治療負担の軽減と QOL の向上に貢献しており、新たな製剤開発においても注目すべき技術である。

2. 免疫疾患治療に向けた新たな標的化 DDS の開発

標的化 DDS を利用した疾患治療を達成するためには、標的 (ターゲット) となる部位 (臓器・細胞) を明確に設定する必要がある。例えば、がん治療においてはがん細胞と言うように、明確な標的細胞が存在するため (実際にはがん組織内の血管内皮細胞や間質等を標的化する治療法もある)、目的やその手法 (標的化のための機能性分子の選択等) も概略化しやすく、また治療に無関係な臓器への薬物送達を制御することが、副作用を抑えた効率的ながん治療法につながることも容易に想像できる。免疫疾患治療においてはどうか。当然のことながら免疫細胞が標的細胞になるが、免疫細胞は多種存在するためどの細胞を標的とするのが治療に適しているかよく考慮する必要

がある。そもそも理想的な免疫疾患治療とはどのようなものが考えられるのであろうか？この答えとして筆者は、従来のような全身の免疫を抑えて発症や進行を抑える治療戦略とは一線を画し、発症や進行の原因となる免疫抗原に対する免疫反応のみを特異的に抑制する治療法であると考え。この治療法が達成できれば、疾患原因の免疫反応を強く抑えることができるだけでなく、従来の治療法にて問題となっており、非特異的な免疫抑制により生じる感染症発症のリスクを極力抑えることができ、安心・安全かつ有効な治療が望める。それではこの目的を達成するためには、どの免疫細胞が標的細胞に当たるのか？またどのようにすればその免疫反応を特異的に抑えることができるのか？筆者らは、原因抗原を認識する免疫細胞を標的とし、その細胞に致死的な影響を与えることができれば、原因抗原を異物として認識する免疫細胞が体内から排除され、抗原特異的な免疫反応を抑えることができるのではないかと考えた。その実現に向け、筆者らは抗原認識免疫細胞を標的化するための新たな DDS の開発に取り組んできた。それは、免疫抗原分子そのものを標的化分子とした抗原修飾リポソームを、抗原認識免疫細胞を標的化する薬物キャリアとして用いる戦略である⁸⁾。この抗原修飾リポソームが免疫抗原と同様に抗原認識免疫細胞に認識され、内封薬物により致死的な細胞障害を与えることで、他の免疫には影響を与えず原因抗原に対する免疫反応のみを抑制できると考えた (Fig. 1)。その概要は抗原分子をおとりとして免疫細胞が薬物キャリアを認識するという、通常の標的化とは逆方向 (通常は薬物キャリアが標的化分子を介して標的細胞を認識する) であることから、逆標的化 DDS (Reverse targeting DDS: RT-DDS) として新たに提唱した⁸⁾。この標的化の最大の利点としては、標的特異性の高さにあると考える。生体における免疫抗原に対する免疫細胞の認識機構は非常に特異性が高いことは周知の事実であるが、その特性を逆手に取って利用する本標的化 DDS の概念は、従来の標的化 DDS に比較して、標的特異性や標的効率の面で非常に優れていると考えている。以降、本 DDS 戦略を用いた免疫疾患治療の成果について紹介したい。

3. アレルギー疾患治療への応用

体外の異物に対する過剰な免疫反応の結果、強い炎症反応を引き起こし症状が現れるアレルギー疾患は、食物アレルギーや花粉症を代表とするように最も身近な免疫疾患と言える。これらの即時型アレルギーは、抗原 (アレルゲン) に初回暴露されて抗原に対する特異的抗体が産生されることがきっかけとなり免疫記憶が成立し、再度抗原に暴露された際に症状が現れる疾患である。このため、いかにして抗原に対する抗体の産生を抑制するかが、アレルギー疾患に対して高い治療効果を得るための鍵とな

る。そのためには、抗原特異的な抗体を産生する細胞（抗原に対する抗体を表面に発現している B 細胞）への薬物標的化の必要があり、特異的な細胞障害により抗体の産生抑制、さらにはアレルギー症状が出るまでの下流シグナルが抑えられるため、強力かつ持続的な治療効果が望める。筆者らは、卵アレルギーのアレルゲンであるオボアルブミン（OVA: Ovalbumin）をアレルギー疾患のモデル抗原として用い、OVA に対する抗体を産生する免疫細胞への標的化のために抗原（OVA）修飾リポソームの調製を行った。そもそもこの抗原修飾リポソームが、免疫抗原として機能するか、さらには抗体産生細胞に抗原特異的に認識されるかが、標的化において重要となる。その標的特異性を確認するために OVA 修飾リポソーム（OVA-Lip）およびヒト血清アルブミン（HSA）修飾リポソーム（HSA-Lip）を調製し、OVA と HSA 両方の抗原を感作したマウスに投与した際の、それぞれの抗原特異的抗体の産生について調べた（Fig. 2）。結果として、OVA-Lip を投与した際には抗 OVA 抗体価、HSA-Lip を投与した際には抗 HSA 抗体価がそれぞれ上昇し、リポソーム表面に修飾した抗原分子に対応した抗体の産生が誘導されることが確認され（Fig. 2C）、抗原修飾リポソームが免疫抗原として認識されることが示された⁹⁾。次に OVA-Lip の標的細胞を探るべく、OVA を感作したマウスに蛍光標識リポソームを投与した後の、免疫細胞が多く存在する脾臓における組織内分布を調べた（Fig. 3）。その結果、OVA を修飾していない未修飾リポソーム（Cont-Lip）においては、脾臓の B 細胞領域の周囲にほとんどが分布していたのに対し、OVA-Lip は B 細胞領域に局在していることが観察された。一方で正常マウスにおいては、どちらのリポソームも B 細胞領域に分布していなかった。すなわち OVA-Lip の標的の一つとして、OVA で感作されたマウスの脾臓内の B 細胞であることが示唆された。この結果を元に、細胞障害性薬物であるドキソルビシン（DOX）を内封した OVA-Lip（OVA-LipDOX）を調製し、OVA 感作マウスに対する治療実験（抗 OVA IgE 抗体の産生抑制効果）を行った（Fig. 4）。この結果、OVA-LipDOX を投与した後に OVA の追加免疫を行なった際（Day 15）の抗 OVA IgE 抗体の産生が、未処置群に比べて有意に抑制されることが明らかとなった（Fig. 4）。また非常に興味深いことに、OVA を修飾していない DOX 内封リポソーム（Cont-LipDOX）を投与したマウスにおいては、抗体産生抑制効果は確認されず、未処置群と同程度の抗体産生が確認された。この結果が意味するところは、リポソーム表面に修飾した抗原分子 OVA の存在が、治療効果を示すのに重要であることである。さらに OVA-LipDOX 投与による抗体産生抑制効果は、その後追加免疫を行なった際（Day 29）にも確認され（Fig. 4）、効果が長期的であることも示された。これらの結果から、OVA-LipDOX は生体内に投与後、脾臓の B 細胞に集積して内封薬物により細胞障害を与えることで

抗体産生を強力かつ長期的に抑制することが示唆された¹⁰⁾。本稿ではデータを示していないが、内封薬物を免疫抑制剤である FK506 に変更した際にも同様の効果を示すことや¹¹⁾、スギ花粉抗原である Cry j 1 を修飾した抗原修飾リポソームを用いた検討においても、スギ花粉症モデルマウスにおける抗 Cry j 1 抗体の産生を抑えることを明らかとしており⁸⁾、抗原修飾リポソームを用いた標的化 DDS 戦略は、アレルギー疾患治療において有効であることを示している。

4. 自己免疫疾患治療への応用

自己免疫疾患は、生体内の自己分子に対する過剰な免疫反応により発症する免疫疾患であり、原因となる自己抗原分子が生体内由来で常時存在することから重篤化や症状が長期化しやすく、また難治性であるケースが多い。視力障害や四肢の麻痺、感覚障害などの様々な症状が起こる多発性硬化症 (Multiple sclerosis: MS) も、自己免疫疾患の一つとして知られており、中枢神経系の神経を構成する髄鞘 (ミエリン) に対する過剰な免疫反応により炎症性脱髄が起こり発症するとされている神経免疫疾患である。MS に対する治療法としては、急性増悪期におけるステロイド製剤の投与や再発予防を目的とした疾患修飾薬の使用が一般的であり、症状緩和の効果は得られるが完治には至らず、また感染症発症などの重篤な副作用の発生リスクと隣り合わせとなるため、治療には細心の注意を払わなければならない¹²⁾。筆者らが考案した抗原修飾リポソームを用いた標的化 DDS は、免疫疾患の原因抗原さえ特定されていれば外因性、内因性問わずに理論上応用可能であると予想されるため、実際に自己免疫疾患治療への応用として MS 治療について検討を試みた¹³⁾。MS の動物モデルとしては、ミエリンの構成成分の一つであるミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質 (MOG) の部分ペプチド (MOG₃₅₋₅₅) を自己抗原としてマウスに免疫することで MS 様の症状を誘導できる、実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を用い、治療用の薬物キャリアとして自己抗原 MOG₃₅₋₅₅ を表面修飾したリポソーム (自己抗原修飾リポソーム、MOG-Lip) を調製した。Fig. 5A には治療薬として調製した DOX 内封 MOG₃₅₋₅₅ 修飾リポソーム (MOG-LipDOX) の調製法を簡略化して示した。まず、MOG₃₅₋₅₅ と活性官能基を有する脂質誘導体 (DSPE-PEG-NHS) を混合して、リポソーム表面への自己抗原修飾用の MOG₃₅₋₅₅ 脂質誘導体 (DSPE-PEG-MOG) を合成し、一方で DOX を内封したリポソーム (Cont-LipDOX) を、硫酸アンモニウムを用いたリモートローディング法 (pH 勾配法) により調製した。それぞれ調製した DSPE-PEG-MOG と Cont-LipDOX を混合することで、DSPE-PEG-MOG をリポソームに外挿し、目的となる MOG-LipDOX を得た。調製した MOG-LipDOX については、粒子径が 150 nm 程度であり (Fig. 5B)、また血清存在下で

もその粒子径および DOX の保持は安定していた (Fig. 5C)。さらにリポソーム表面への MOG₃₅₋₅₅ の修飾を確認するため、リポソームの抗体への結合を調べたところ、MOG-LipDOX が抗 MOG₃₅₋₅₅ 抗体に対してリポソーム表面の MOG₃₅₋₅₅ 分子を介して特異的に結合することを明らかとした (Fig. 5D)。

EAE も含め MS は、T 細胞性免疫が主として進行する自己免疫疾患である。そこで MOG-Lip の標的細胞を調べるために、EAE マウスに尾静脈内投与後の脾臓におけるリポソームの組織内分布を調べた。T 細胞を免疫染色し、蛍光標識した MOG-Lip の脾臓内分布を観察したところ、MOG-Lip は脾臓内 T 細胞と共局在することが明らかとなった (Fig. 6A)。さらに MOG-LipDOX を投与した EAE マウスから脾臓細胞を採取し、FACS により自己抗原認識免疫細胞である MOG 認識 T 細胞数の解析を行ったところ、MOG-LipDOX を処置することで MOG 認識 T 細胞数が減少することを確認した。これらの結果は、MOG-LipDOX の標的細胞が脾臓内 MOG 認識 T 細胞であること、また内封する DOX により細胞障害を与えることができることを示している。この結果をもとに、EAE マウスにて症状が現れる四肢麻痺などの運動神経障害による運動機能低下 (臨床症状) に対する治療効果の検討を行った。EAE マウスに対して、DOX 投与量として 0.1 mg/kg/day (通常がん治療実験で用いられる投与量の 1/10~1/100 量) の MOG-LipDOX の投与を行った後のマウスの臨床症状の観察を行ったところ、MOG-LipDOX 投与群では、未処置群に比べ有意に改善されることを明らかとした (Fig. 7A)。また比較として投与した DOX や Cont-LipDOX ではほとんど治療効果は確認されず、MOG-Lip 投与群では若干の効果は観察されたが、MOG-LipDOX 投与群はさらに高い治療効果を示した。さらに EAE 誘導から 100 日以上経過したマウスにおいてもその効果は持続しており、完治したマウスも確認された (Fig. 7A)。また、運動神経の中核となる脊髄における病理学的解析を行ったところ、MOG-LipDOX 投与群では EAE で観察される免疫細胞の浸潤が抑制されていることも確認した (Fig. 7B)。また本稿では紹介しきれなかったが、再発寛解型 MS モデルに対しても、DOX 内封自己抗原修飾リポソームが高い治療効果を示すことを明らかとしている。詳しいデータについては、既に学術雑誌に論文掲載されているので (Shimizu *et al.*, *J Control Release (Open Access)*, 335, 389-397 (2021))¹⁴⁾、ぜひ参照されたい。このように、抗原修飾リポソームを用いた標的化 DDS 戦略は、自己免疫疾患の一つである MS に対しても有用であり、免疫疾患に対する新たな治療法として、その期待が高いことが示された。

おわりに

免疫細胞への薬物標的化については、B 細胞、T 細胞、樹状細胞などへと特異マーカ

一に対する抗体等を標的化分子として用いて免疫の制御や細胞障害を与える手法が主として行われ、その有用性が報告されているが、抗原非特異的な免疫制御のリスク回避はできておらず、副作用の不安は拭えていない。本稿にて紹介した免疫抗原分子を標的化分子として用いる標的化 DDS は、疾患の原因抗原を認識する免疫細胞群を標的化できるため、他の免疫への影響を極力抑え、薬物投与量の低減に伴う副作用発生の回避もできるため、安心、安全かつ有効な免疫疾患治療を提供できると考えている。また原因抗原が特定できていれば、理論上どの免疫疾患に対しても適用可能であるため、汎用性の面でも優れていると言える。免疫疾患治療の新たな展開における標的化 DDS の利用とその創薬について、今後も注視していきたい。

参考文献

1. Kosuke Shimizu, Naoto Oku: Liposomes conjugated with a pilot molecule. *Cancer Drug Delivery Systems Based on the Tumor Microenvironment: Part III Hybrid Technique of Active and Passive Targeting* (Y. Matsumura, D. Tarin Edit), Springer, 187-216 (2019)
2. Kosuke Shimizu, Yoshihito Takeuchi, Kazuma Otsuka, Tomoya Mori, Yudai Narita, Shohei Takasugi, Yasuhiro Magata, Yasuhiro Matsumura, Naoto Oku: Development of tissue factor-targeted liposomes for effective drug delivery to stroma-rich tumors. *J. Control. Release*, 323, 519-529 (2020)
3. Naoto Oku, Mina Yamashita, Yurie Katayama, Takeo Urakami, Kentaro Hatanaka, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Hideo Tsukada, Shuji Akai, Hiroaki Kanazawa: PET imaging of brain cancer with positron emitter-labeled liposomes. *Int. J. Pharm.*, 403, 170-177 (2011)
4. Takayuki Ishii, Tomohiro Asai, Dai Oyama, Tatsuya Fukuta, Nodoka Yasuda, Kosuke Shimizu, Tetsuo Minamino, Naoto Oku: Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. *J. Control. Release*, 160, 81-7 (2012)
5. Yudai Narita, Kosuke Shimizu, Keisuke Ikemoto, Ryuji Uchino, Mutsumi Kosugi, Marten B Maess, Yasuhiro Magata, Naoto Oku, Mikako Ogawa: Macrophage-targeted, enzyme-triggered fluorescence switch-on system for detection of embolism-vulnerable atherosclerotic plaques. *J. Control. Release*, 302, 105-115 (2019)
6. Thanh-Huyen Tran, Mansoor M Amiji: Targeted delivery systems for biological therapies of inflammatory diseases. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 12, 393-414 (2015)
7. Ning Wang, Minnan Chen, Ting Wang: Liposomes used as a vaccine adjuvant-delivery system: From basics to clinical immunization. *J. Control. Release*, 303, 130-150 (2019)

8. 清水広介: 逆標的化 DDS: 新概念の標的化 DDS による免疫疾患治療. 薬剤学, R&D, 78, 56-61 (2018)
9. Kanae Ichikawa, Takeo Urakami, Sei Yonezawa, Haruna Miyauchi, Kosuke Shimizu, Tomohiro Asai, Naoto Oku: Enhanced desensitization efficacy by liposomal conjugation of a specific antigen. *Int. J. Pharm.*, 336, 391-395 (2007)
10. Kanae Ichikawa, Tomohiro Asai, Kosuke Shimizu, Sei Yonezawa, Takeo Urakami, Haruna Miyauchi, Hiroto Kawashima, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Naoto Oku: Suppression of immune response by antigen-modified liposomes encapsulating model agents: A novel strategy for the treatment of allergy. *J. Control. Release*, 167, 284-289 (2013)
11. Kosuke Shimizu, Haruna Miyauchi, Takeo Urakami, Kanae Yamamura-Ichikawa, Sei Yonezawa, Tomohiro Asai, Naoto Oku: Specific delivery of an immunosuppressive drug to splenic B cells by antigen-modified liposomes and its anti-allergic effect. *J. Drug Target.*, 24, 890-895 (2016)
12. 清水広介 : Clinical Topics: 多発性硬化症治療の現状と DDS 創薬. 別冊 BIO Clinica: 慢性炎症と疾患 自己免疫疾患 (高柳広編), 北隆館, 9, 137-141 (2020)
13. 清水広介: 自己抗原認識免疫細胞への薬物送達と多発性硬化症治療. *Drug Delivery System*, 35-5, 367-375 (2020)
14. Kosuke Shimizu, Kazuki Agata, Shohei Takasugi, Shungo Goto, Yudai Narita, Tomohiro Asai, Yasuhiro Magata, Naoto Oku: New strategy for MS treatment with autoantigen-modified liposomes and their therapeutic effect. *J. Control. Release*, 335, 389-397 (2021)

Figure legends

Fig. 1. Targeting drug delivery to antigen-recognizing immune cells with antigen-modified liposome

Fig. 2. Induction of antibody production in antigen-sensitized mice by injection of antigen-modified liposomes

(A) Experimental schedule until the measurement of blood concentration of antibodies. (B) Illustration of OVA-Lip and HSA-Lip. (C) Blood concentrations of anti-OVA and anti-HSA antibodies after the injection of OVA-Lip or HSA-Lip. Significant differences are shown (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.01$). OVA: Ovalbumin; HSA: Human serum albumin; Alum: Aluminium hydroxide.

Fig. 3. Targetability of OVA-Lip to splenic B cells

DiIC₁₈-labeled Cont-Lip or OVA-Lip (red) was intravenously injected into naive or OVA-sensitized mice via a tail vein, and 12 h later, the splenic sections were prepared and probed with Alexa488-labeled anti-mouse IgG antibody (green) for B cell staining. Distribution of fluorescence was observed under a confocal laser-scanning microscope.

Fig. 4. Suppression of anti-OVA antibody production by the treatment with OVA-LipDOX

OVA-sensitized mice were intravenously injected with 0.3 M glucose (Vehicle), unmodified liposome encapsulating DOX (Cont-LipDOX), OVA-modified liposome (OVA-Lip), or OVA-LipDOX on day 8, 10 and 12 after OVA immunization, and then booster injections of OVA were given at day 15 and 29. Blood samples were collected at day 22 and 36; and ELISA was performed to measure the blood concentration of anti-OVA IgE antibody. Significant differences are shown (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

Fig. 5. Preparation of MOG-LipDOX for the treatment of EAE.

(A) Preparation method of MOG-LipDOX. Autoantigenic MOG₃₅₋₅₅ peptide was reacted with DSPE-PEG-NHS to produce DSPE-PEG-MOG lipid derivative. On the other hand, DOX was encapsulated into plain liposome composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and cholesterol by a pH-gradient method to prepare liposomal DOX (Cont-LipDOX). Then, DSPE-PEG-MOG was mixed with Cont-LipDOX to prepare MOG-LipDOX. (B) Transmission electron

microscope (TEM) image of MOG-LipDOX. (C) Stability of MOG-LipDOX in the presence of serum. MOG-LipDOX was incubated with fetal bovine serum for 6 h, and then particle size and DOX encapsulation was evaluated. (D) Binding ability of MOG-LipDOX to control antibody or anti-MOG₃₅₋₅₅ antibody analyzed by Biacore system.

Fig. 6. Targetability of MOG-LipDOX to splenic T cells

(A) Intrasplenic distribution of MOG-Lip. DiO-labeled Cont-Lip or MOG-Lip (green) was intravenously injected into EAE mice via a tail vein on day 10 after MOG immunization and allowed to circulate for 3 h. Then, the splenic sections were prepared and probed with anti-CD3 antibody-PE (red) for T cell staining and DAPI (blue) for nuclear staining. Fluorescence was observed under a confocal laser-scanning microscope. Magnified images in each region are shown (a, b). (B) Cell damage of MOG-recognizing T cells after the treatment with MOG-LipDOX. EAE mice were treated twice with PBS, DOX, Cont-LipDOX, MOG-Lip or MOG-LipDOX at a dosage of 0.1 mg/kg/day as DOX on days 10 and 14. On day 16, the collected splenocytes were probed with anti-CD4 antibody-FITC and I-Ab MOG₃₅₋₅₅ Tetramer-PE. Then, FACS analysis was carried out.

Fig. 7. Therapeutic effect of MOG-LipDOX on EAE

(A) Therapeutic effect of MOG-LipDOX on EAE symptoms. EAE mice were intravenously injected with PBS, DOX, Cont-LipDOX, MOG-Lip, or MOG-LipDOX via a tail vein at the DOX dosage of 0.1 mg/kg/day on days 10, 14, and 22. The clinical symptoms were monitored and scored based on the 13 grades. Significant difference was shown (***, $P < 0.001$). The clinical symptom grades of each mouse on day 101 were also shown. (B) Suppression of EAE-induced immune cell invasion at spinal cord by the treatment with MOG-LipDOX. Spinal cords of naive or EAE mice treated with PBS, DOX, Cont-LipDOX, MOG-Lip, or MOG-LipDOX were collected at day 24; and HE staining of their sections were carried out. Circle area shows the region of interest.

Fig.1

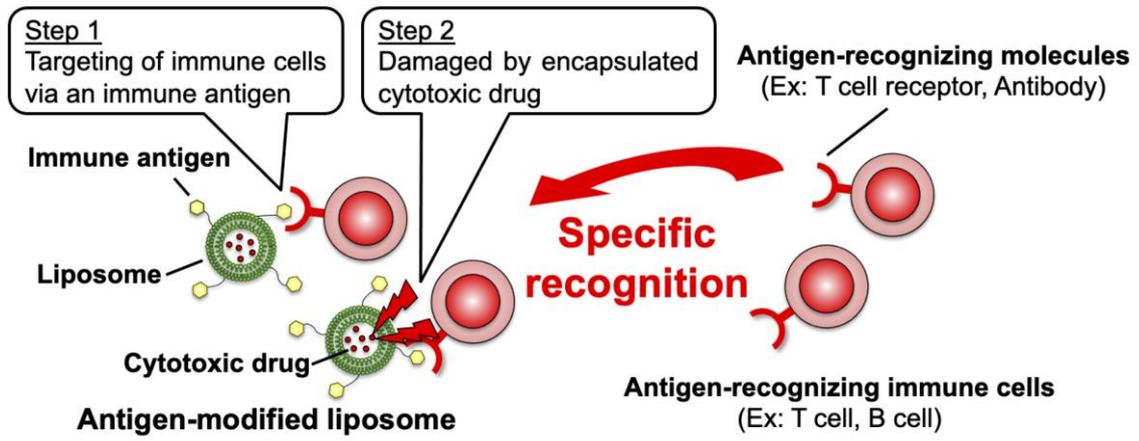


Fig.2

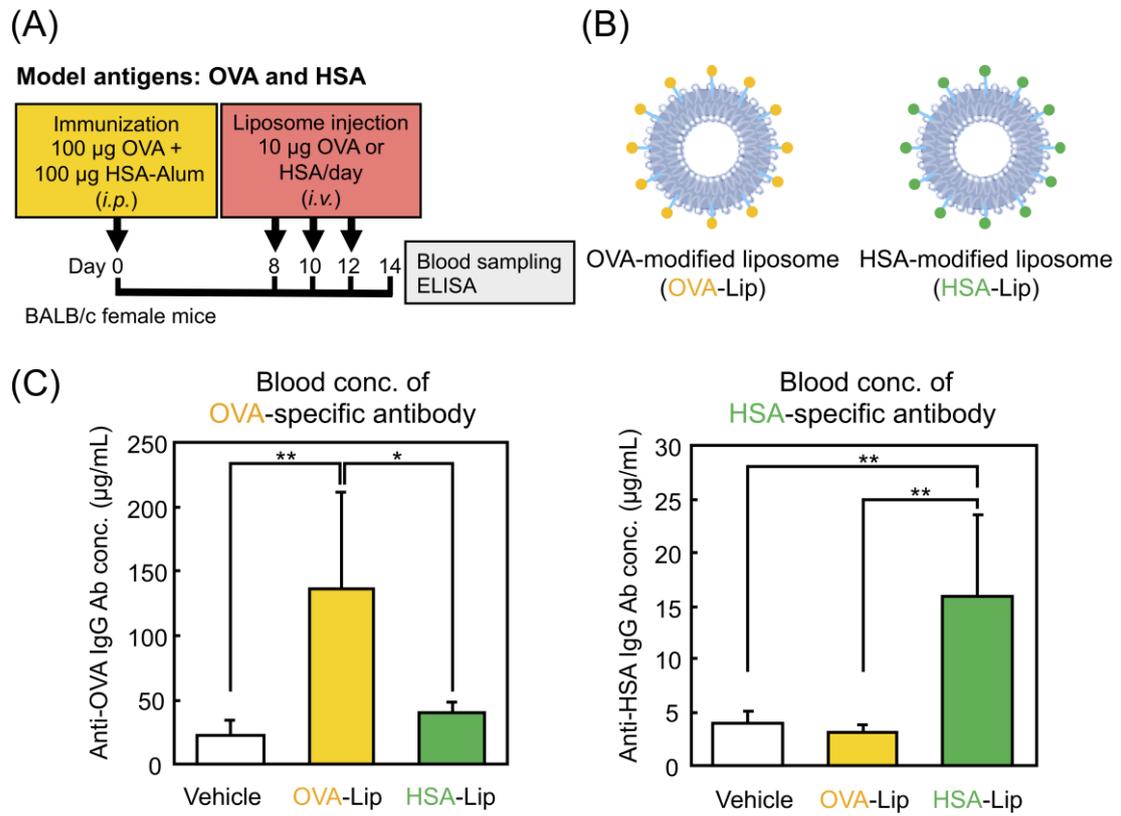
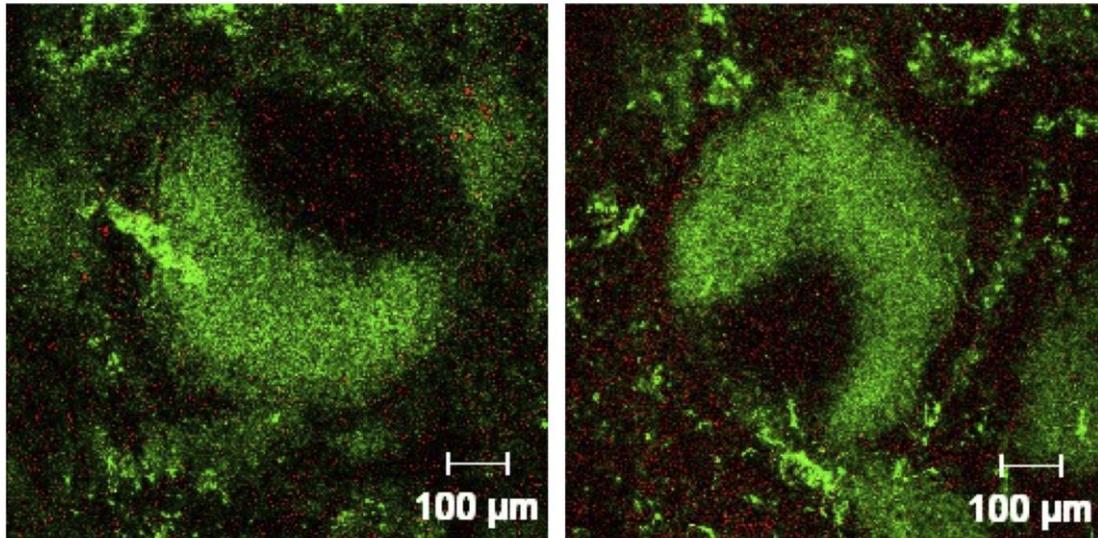
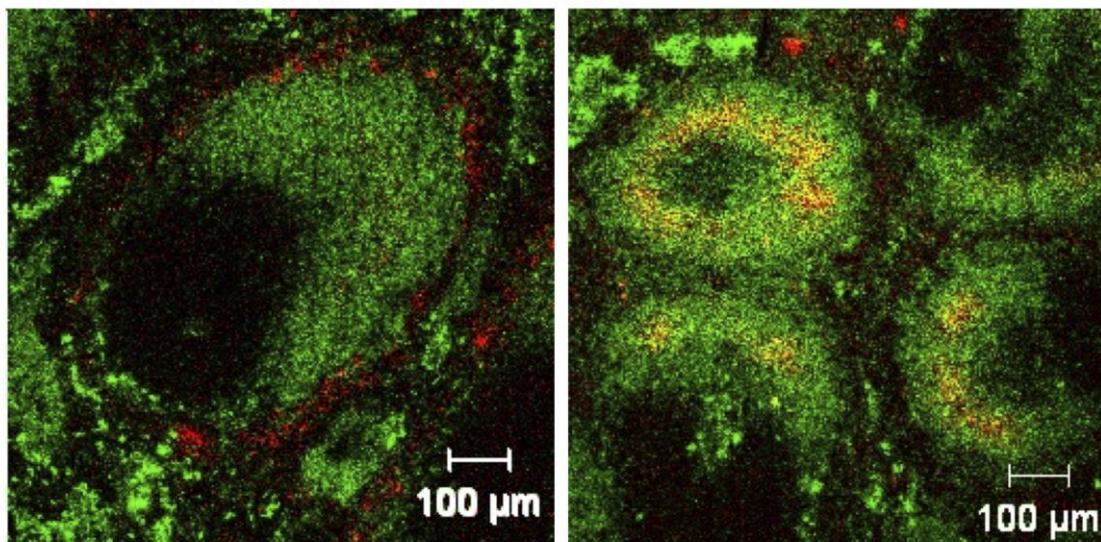


Fig.3

Naive mouse



OVA-sensitized mouse



Cont-Lip

OVA-Lip

Liposome (DilC₁₈) B cell (Anti-IgG Ab-Alexa488)

Fig.4

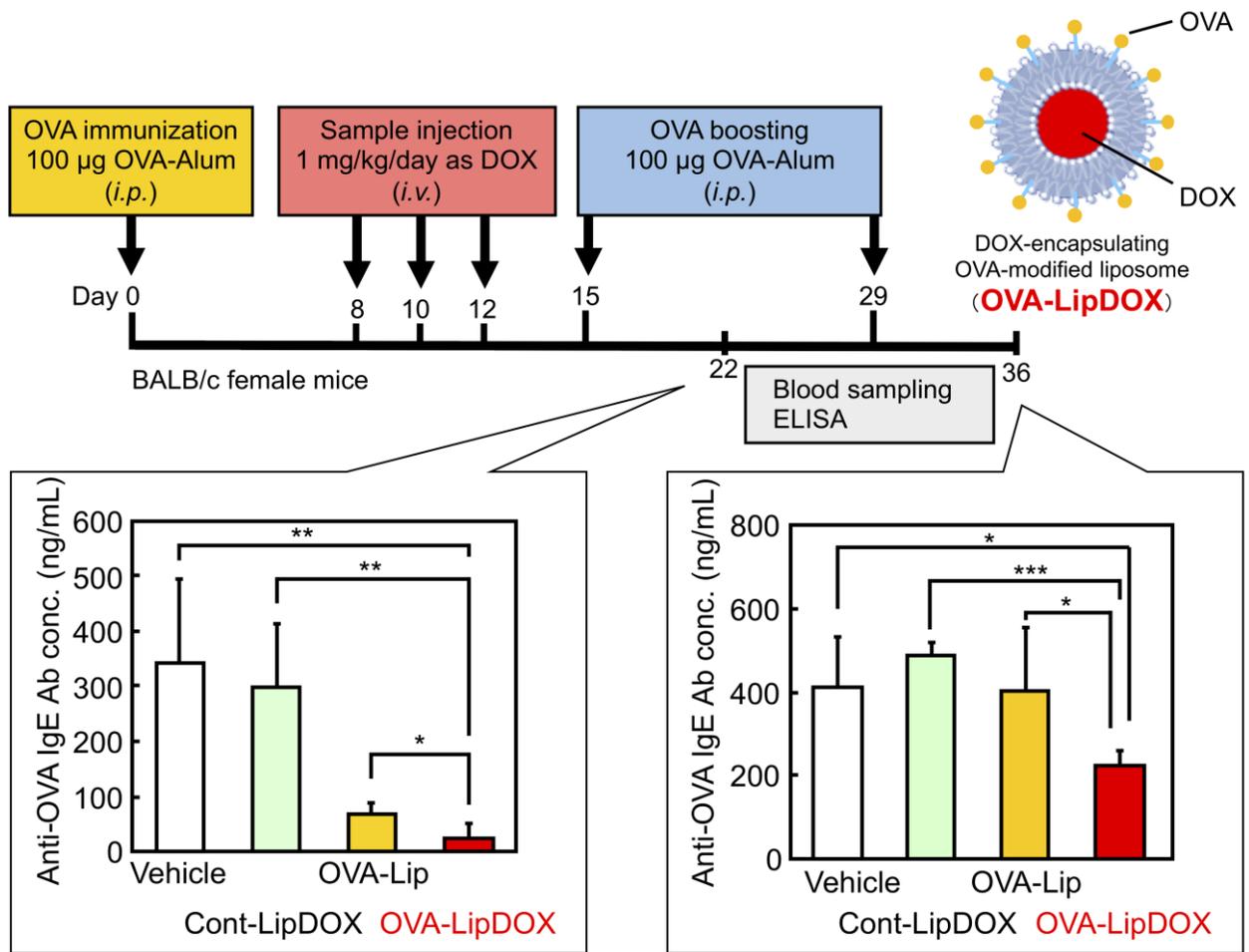


Fig.5

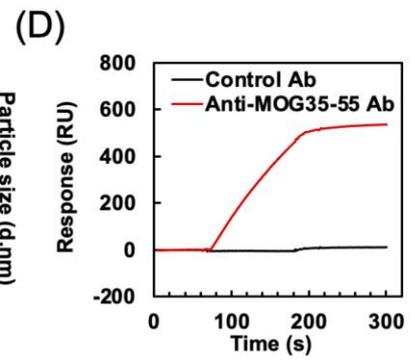
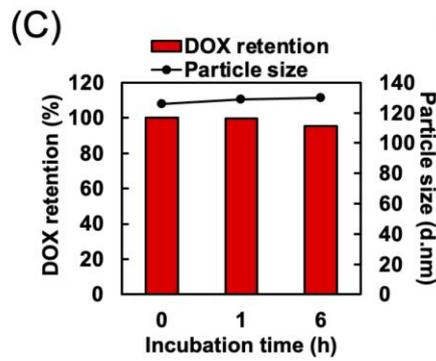
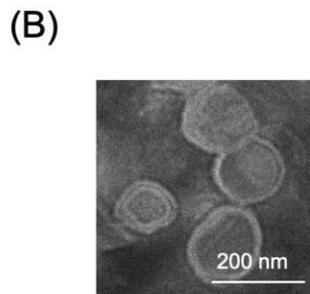
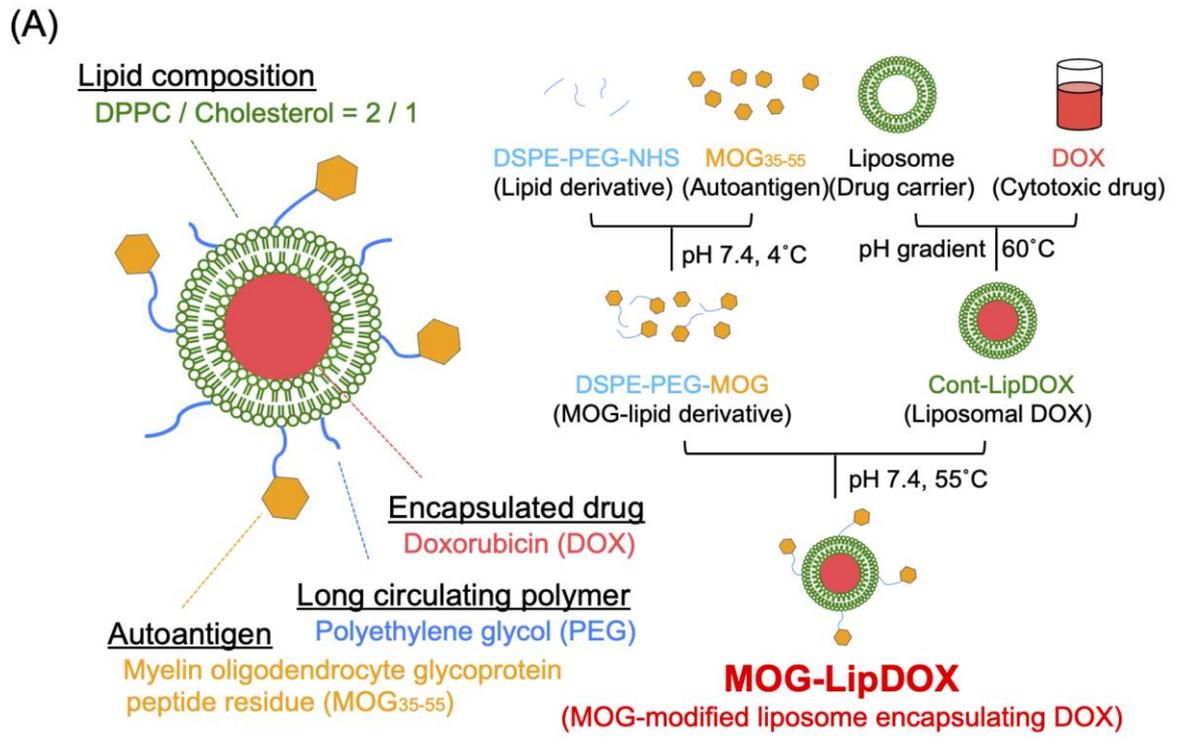
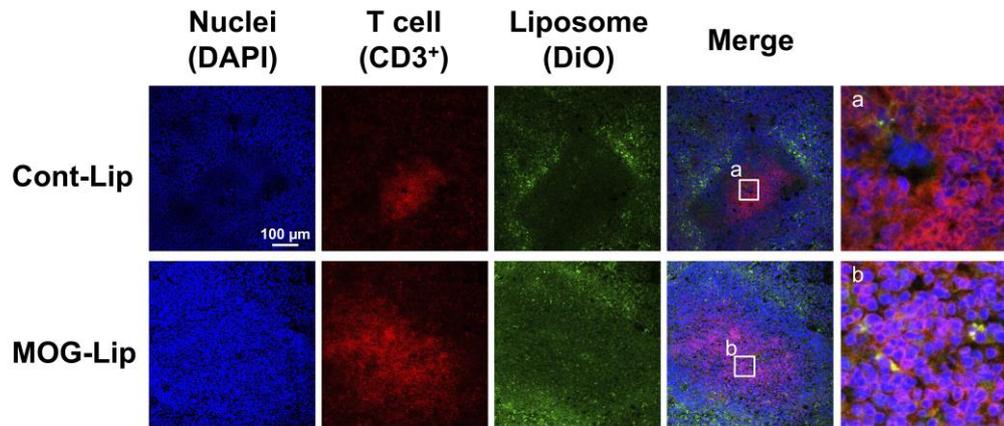


Fig.6

(A)



(B)

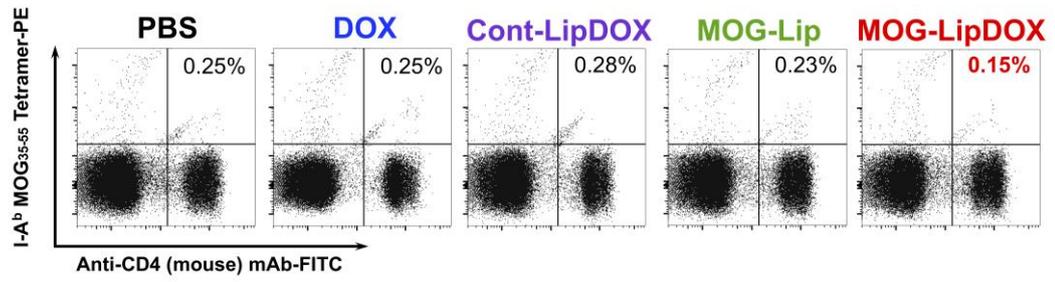


Fig.7

