

DDS 医薬の創製

石原 務

日大工・生命

【緒論】

原発性肝臓がんは、主として肝炎ウイルス感染を起因に慢性肝炎・肝硬変を経て進行し、その死者数は国内だけで年3万人を超える。しかしながら、その一連の疾患に対する決定的な治療法はなく、特に肝臓がんにまで進展してしまうと生存率は劇的に低下する。平成23年度には厚労省が「肝炎研究10ヵ年戦略」を取りまとめており、これらの肝疾患を克服することの重要性・緊急性が窺い知れる。そこで、本研究では、独自のDDS技術を用いた創薬研究戦略に基づき、肝炎と肝硬変に対する非侵襲的な薬物療法を確立することを目指し、具体的には、二つの薬物キャリア（①ウイルス性慢性肝炎治療のため肝実質細胞を標的とするナノ粒子と②肝硬変治療のため肝星細胞を標的とするナノ粒子）の開発を試みた。

① 肝実質細胞を標的としたナノ粒子の開発

【背景】

現在のC型慢性肝炎治療では、様々な薬物が併用投与されている。その薬物の一つが抗ウイルス薬のリバビリンであるが、溶血性貧血の副作用を伴う。そこで、副作用低減と薬効の向上を目指し、リバビリンを内部に包埋し、かつ肝実質細胞のアシアロ糖タンパク質レセプターに結合するリガンド分子を表面に配した生分解性ポリマーからなるナノ粒子の開発を試みた。

【実験方法】

ナノ粒子は、アラビノガラクトサンとポリグルタミン酸のコンジュゲート(AG-PLG)、末端にアミノ基を導入したポリ乳酸(PLA-N)、リバビリンーリン酸(RMP)を溶解したDMSO溶液を水相に添加

するOil-in-water型溶媒拡散法により調製した。その際、各化合物の量や添加速度が、ナノ粒子の大きさ及びリバビリンの封入率に及ぼす影響を評価した。HepG2細胞(ヒト肝癌由来細胞株)へのナノ粒子の取り込みは、蛍光化合物をラベルしたナノ粒子を37°Cで細胞とインキュベートした後、細胞を蛍光顕微鏡で観察し評価した。また、ナノ粒子の細胞毒性はWST-8アッセイにより評価した。

【結果と考察】

以前の我々の研究では、肝実質細胞へリバビリンを選択的に運搬するため、ナノ粒子表面にガラクトースを主成分とした多糖のアラビノガラクトサンを配したナノ粒子を調製した。このナノ粒子をマウスの静脈内に投与したところ、肝臓に大量のリバビリンが運搬されかつ長期にわたりそこに残留していた¹⁾。しかしながら、このナノ粒子では、アラビノガラクトサンを粒子表面に固定する際にポリカチオンのポリリジンを用いているため細胞毒性が認められた。そこで、本研究では細胞毒性が低い新たなリバビリン封入高分子ナノ粒子の作製を試みた。

ポリリジンあるいはポリグルタミン酸とアラビノガラクトサンのコンジュゲート(AG-PLL, AG-PLG)、末端がカルボキシ基あるいはアミノ基のPLA(PLA-C, PLA-N)をそれぞれコーティング剤及びコア物質として用いナノ粒子を調製した(Table 1)。ゼータ電位測定からAG-PLLあるいはAG-PLGが粒子表面にコーティングされていることが明らかになった。ナノ粒子をリン酸緩衝液中(pH7.5)にて37°Cでインキュベートし、ナノ粒子からのリバビリン放出挙動を解析すると、リバ

ビリンはナノ粒子から約 20 日にわたり少しずつ徐放出されていることが明らかになった (Fig. 1)。

Table 1 Nanoparticle characteristics

Code	Coating polymer	Core polymer	ζ -potential (mV)	Diameter (nm)	RMP loading efficiency (wt.%)
None/C-NP	None	PLA-C	-43.4	107	N.D.
None/N1-NP	None	PLA-N1	-0.1	167	N.D.
None/N3-NP	None	PLA-N3	5.1	143	N.D.
PLG/N1-NP	AG-PLG	PLA-N1	-5.5	158	0.1
PLG/N3-NP	AG-PLG	PLA-N3	-4.1	88	0.6
PLL/C-NP	AG-PLL	PLA-C	0.0	77	0.8

The diameters and ζ -potentials were measured three times and the mean values were shown. N.D.: not determined

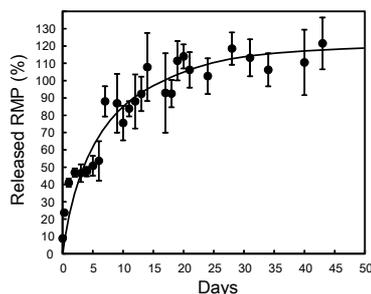


Figure 1. Release behavior of RMP from the nanoparticles.

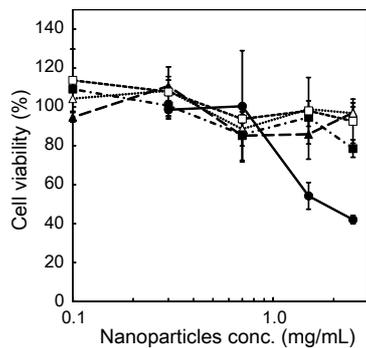


Figure 2. Cytotoxicity of various nanoparticles. HepG2 cells were incubated with PLG/N1-NP (open triangle), PLG/N3-NP (closed triangle), None/N1-NP (open square), None/N3-NP (closed square), or PLL/C-NP (closed circle) in Opti-MEM for 24 h.

ローダミンでラベルしたナノ粒子を用い細胞への取り込みを観察すると、AG-PLG を用いずに作製したナノ粒子に比べ、用いたナノ粒子では顕著な細胞への取り込みが観察された。これは、ナノ粒子表面の AG がリガンドとなりレセプター依存のエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたためと考えられる。また、AG-PLL を用い作製したナノ粒子では顕著な細胞毒性を示したのに対し、AG-PLG を用い作製したナノ粒子はほとんど細胞毒性を示さなかった (Fig. 2)。さらに、

マウスでの実験から、AG-PLG を用いたナノ粒子は、肝臓に集積することが明らかになった。

以上より、このナノ粒子は次のような機能 **①** リバビリンの赤血球への移行を回避し副作用を軽減できる、**②** リバビリンがナノ粒子から徐放出され薬効が長期持続できる、**③** 肝実質細胞へ選択的に運搬できる、**④** 粒子自体が細胞毒性を示さないを有する新たな慢性肝炎治療薬としての利用が期待される。

② 肝星細胞を標的としたナノ粒子の開発

【背景】

慢性肝炎が進行すると肝硬変にいたる。肝硬変は不可逆性の病態であり、非代償性期肝硬変では根治治療法がなく合併症の対症療法が基本治療方針である。一方、実験的動物モデルでは可逆的に肝硬変症状が緩和したとの多数の報告があり、特に肝線維化に中心的な役割を担う肝星細胞のコラーゲン産生を抑制することが有効な治療法につながると考えられている。しかし、現行の抗線維化薬は全身に分布し強い副作用を示すため、臨床で肝硬変治療に応用するのは難しい。そこで、本研究では、抗線維化薬を肝星細胞に選択的に運搬できるナノ粒子を開発することを目的とする。抗線維化薬としては、COX-2 選択的阻害薬であり主に関節リウマチや腰痛症などに対し消炎・鎮痛効果を有するセレコキシブを用いた。セレコキシブは近年肝星細胞のアポトーシス誘導やコラーゲン産生抑制効果が見出されている。しかし、セレコキシブは全身に分布してしまい代謝されやすい。そこで、肝星細胞へ選択的にセレコキシブを集積させるため、肝星細胞に特異的に結合するペプチドを修飾したナノ粒子の作製を試みた。

【実験方法】

肝星細胞に発現している血小板由来増殖因子

受容体(PDGFR)に特異的に結合する環状ペプチド(pPB, 配列: KGGCSRNLIDC)をリガンド分子として用いた。pPBを末端に導入したポリエチレングリコールとポリ乳酸からなるブロックポリマーを合成した。ナノ粒子は、このポリマーとポリ乳酸、セレコキシブを溶解したDMSOを水中に添加するOil-in-water型溶媒拡散法により調製した。細胞との相互作用は、PDGFRが発現しているTWNT-1細胞(ヒト不死化肝星細胞株)あるいはHeLa細胞(ヒト子宮頸がん由来細胞株)を用い評価した。また、蛍光物質を修飾した18merのオリゴDNAあるいはローダミンを内封したナノ粒子を調製し、細胞への取り込みを評価した。

【結果と考察】

蛍光ラベルしたpPB自体が顕著にTWNT-1細胞に取り込まれたことから、pPBがリガンドとして機能することが示唆された。pPBを導入したブロックポリマーの合成は、SECと¹H-NMR解析から確認した。このポリマーとポリ乳酸を用いナノ粒子を調製し、TWNT-1細胞あるいはHeLa細胞への取り込み評価を行った。その結果、pPB未修飾ナノ粒子に比べ修飾ナノ粒子の方が多く細胞に取り込まれていた。その取り込みは、pPBを大量に共添加することで抑制された。さらに、リソソーム染色試薬であるLysoTracker Redを共添加すると、細胞内の分布がほぼ一致していたことから、取り込まれたナノ粒子はリソソームに分布していることが示唆された。よって、pPBがリガンド分子としてPDGFRに特異的に結合し、エンドサイトーシスによってナノ粒子が細胞内に取り込まれたと考えられる。セレコキシブの細胞毒性試験をWST-8アッセイにより行ったところ、100 μ M以上で細胞死が確認できた。また、Hoechst33258で染色すると高濃度のセレコキシブで核内の強い青色蛍光が観察されたことからクロマチン凝縮に伴うアポトーシスであることが示唆された。

一方、肝硬変の遺伝子治療を目指しセレコキシブに代わり核酸分子を封入したナノ粒子の作製も試みた。末端アミノ化ポリ乳酸を用いることでオリゴDNAが粒子内に有意に包埋できることが分かった。

以上より、pPB修飾ナノ粒子は肝星細胞へ特異的に薬物を運搬するキャリアとしての利用が期待できる。

【参考文献】

- 1) Ishihara T, *et al*, J Pharm Sci. 103: 4005-4011 (2014)