

DDS 医薬の創製

石原 務
日大工・生命

【緒論】

平成 29 年度は、主として、i) 化学修飾を施したタンパク質医薬、ii) 遺伝子治療のための核酸キャリア、iii) 肝疾患治療のための薬物キャリア (ナノ粒子) の三つの創薬研究を実施した。ここでは特にタンパク質医薬と肝疾患に対するナノ粒子に関する研究成果について報告する。

【レシチン化タンパク質の腸管吸収性評価】

我々はこれまでに、タンパク質にレシチンを化学修飾したレシチン化タンパク質を開発してきた。タンパク質としては、生体内で生じる活性酸素のスーパーオキシドアニオン (O_2^-) を消去するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を主に用いた。レシチン化したスーパーオキシドジスムターゼ (PC-SOD) は、SOD に比べ約 17% のスーパーオキシドアニオン消去能しかなかった。しかしながら、HL-60 細胞 (ヒト前骨髄性白血病由来細胞株) が細胞外に産生するスーパーオキシドアニオンは、SOD より PC-SOD の方が顕著に消去した。これは、レシチンを修飾することで SOD が細胞膜上や細胞内に取り込まれたためと考えられた。

多くのタンパク質が医薬品として臨床利用されているが、通常これらの投与経路は皮下や筋肉内、静脈への注射に限られる。一方、経口による腸管吸収経路は簡便で負荷が少ないが、タンパク質は消化管からほとんど吸収されない。そこで、前述したようにレシチン化によりタンパク質の細胞親和性が向上することから、腸管吸収性も向上するのではないかと考え PC-SOD の腸管吸収性を評価した。

細胞はヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞を種々の濃度で播種し、2 日間 37°C でインキュベートした。FITC ラベルした SOD あるいは PC-SOD を添加し、3 時間 37°C でインキュベートした後、蛍光顕微鏡を用い細胞への取り込みを評価した。

細胞層透過性は次のように試験した。Caco-2 細胞をトランスウェルインサート上に播種し、21 日間培養した (図 1)。培地交換は 3~4 日おきに行なった。トランスウェルインサートは、ポリカーボネート (PC) 製とポリエチレンテレフタレート (PET) 製の 2 種類を使用した。培養した Caco-2 細胞の Apical 側の培地中に FITC ラベルした SOD あるいは PC-SOD を添加し、4 時間あるいは 12 時間 37°C でインキュベートした。その後、細胞層を透過し Basal 側の培地中に移行した SOD あるいは PC-SOD を蛍光光度計を用い定量した。また、使用した細胞層が損壊していないかは細胞層を透過しないルシファーイエローを用い確認した。さらに、対照として、ケトプロフェンあるいは FITC ラベルしたインシュリンと細胞膜透過ペプチドのペネトラチンの混合物を用い同様に試験した。

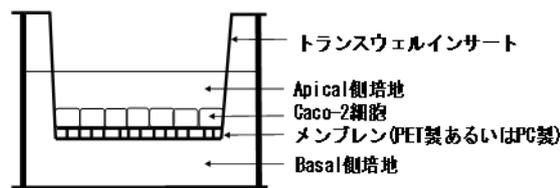


図 1. トランスウェルによる Caco-2 細胞層の透過試験

初めに、Caco-2 細胞への PC-SOD の取り込みを評価した。SOD では取り込みが全くみられなかったのに対し、PC-SOD では細胞間隙に局在してい

た。一方、HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん由来細胞株)では PC-SOD は細胞内に取り込まれた。

次に、PET 製トランスウェルインサートを用い、PC-SOD の Caco-2 細胞層透過試験を行なった。インキュベーション時間が長いほど透過率が高まり、時間に依らず PC-SOD が SOD より 2 倍ほど高い透過率を示した。一方、腸管吸収性が高い低分子化合物のケトプロフェンの透過率は、PC-SOD の透過率よりはるかに高かった。また、PC 製トランスウェルインサートを用い 12 時間インキュベートを行なったところ、透過率は PC-SOD、SOD 共に PET 製よりも高く、PC-SOD の透過率は SOD より 3 倍程度高かった(図 2)。

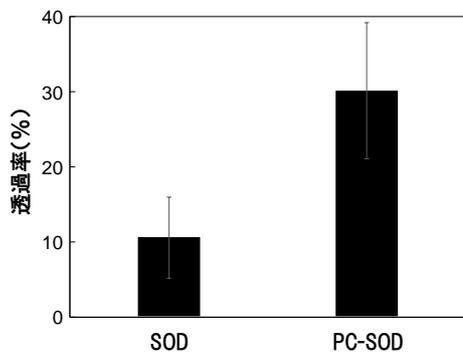


図 2. タンパク質の Caco-2 細胞層透過

一方、森下らはタンパク質に細胞膜透過ペプチドを混合することで、タンパク質の腸管吸収性が増大することを報告している。そこで、対照としてインシュリンとペネトラチンの混合物の評価も行った。その結果、既報のとおりインシュリン単独よりもペネトラチンを混合することでインシュリンの透過率は約 3 倍増加した。また、その透過率は PC-SOD の約 2 倍であった。

以上より、レシチンを修飾することで SOD の細胞層透過性が向上することが明らかになった。また、その透過経路は細胞内ではなく細胞間であることが示唆された。さらに、タンパク質の種類が異なるので単純に比較するのは難しいが、レシチン修飾は、細胞膜透過ペプチドを混合する手法と同程度の透過性の向上をもたらすことが

示唆された。

【レシチン化抗体の開発】

前述したレシチン修飾技術を SOD 以外のタンパク質にも応用し、改良型バイオ医薬品いわゆるバイオベターの開発を試みた。タンパク質としては抗体に着目した。現在多数の抗体医薬が開発されているが、抗体は細胞膜上あるいは細胞外の抗原に特異的に結合し高い治療効果を示す。しかし、抗体は組織/細胞親和性に乏しいため全身に存在する抗原に作用してしまい、場合によっては強い副作用を伴う。また、抗体医薬は細胞内に侵入することが難しいため細胞内抗原を標的にはできない。そこで本研究では、レシチン修飾により抗体の体内動態を変え抗体医薬の有用性を高めようと考えた。

モデル抗体として牛血清由来の γ グロブリンを用いた。サイズ排除クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーによる解析により、グロブリンはレシチンの仕込み量に応じ修飾されることがわかった。また、電気泳動解析からレシチン修飾グロブリンと血漿タンパク質が相互作用(結合)していることがわかり、血中に長く滞留できることが示唆された。さらに、HeLa 細胞や HL60 細胞への取り込みを評価したところ、グロブリンは全く取り込まれなかったが、レシチン修飾グロブリンは細胞内に多く移行していた。特に、グロブリンに対するレシチンの仕込み重量比 0.3 で作製した修飾体で最大の取り込みを示したことから、細胞親和性を高めるための最適なレシチン修飾率が存在することが明らかになった。

これらのことから、レシチン修飾グロブリンは白血球などの細胞膜上に局在あるいは細胞内に取り込まれ標的となる分子と結合できると考えられる。よって、新しいタイプの抗体医薬としての利用が期待できる。

【肝疾患治療のためのナノ粒子の開発】

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・肝硬変を経て進行する。しかしながら、肝臓がんや肝硬変に対する決定的な治療法はない。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標とした。

これまでの我々の研究にて、肝実質細胞選択的に抗ウイルス剤であるリバビリンを運搬するナノ粒子を作製してきた。しかしながら、このナノ粒子にはポリカチオンが含有されているため、強い細胞毒性が認められた。そこで、次に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てきた。ポリカチオンの代わりにポリアニオンを用いナノ粒子を調製したところ、ほとんど細胞毒性を示さなかった。さらに、マウスでの実験から、このナノ粒子が肝臓に集積することが明らかになった。よって、このナノ粒子は、肝実質細胞へ選択的にリバビリンを運搬可能で、かつ副作用も低い新たな肝炎治療薬として利用できる¹⁾。

一方、肝硬変の治療を目指し抗線維薬を封入した高分子ナノ粒子の開発もおこなってきた。肝硬変治療には、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であると考えられている。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した。抗線維化薬としては、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セレコキシブを用いた。また、肝星細胞へ選択的に薬物を集積させるため、肝星細胞に特異的に結合するペプチド(pPB)を修飾したナノ粒子を作製した。このナノ粒子の肝星細胞由来培養細胞(TWNT-1 細胞)への取り込みを評価すると、pPB に依存し取

り込まれることが明らかになった。また、ナノ粒子を細胞に取り込ませた後、細胞のコラーゲン産生量を測定した。その結果、pPB を修飾していないナノ粒子に比べ pPB を修飾したナノ粒子では顕著なコラーゲン産生抑制効果を示した(図 3)。よって、pPB 修飾ナノ粒子は肝星細胞特異的にセレコキシブを運搬可能な抗線維化薬としての利用が期待できる。

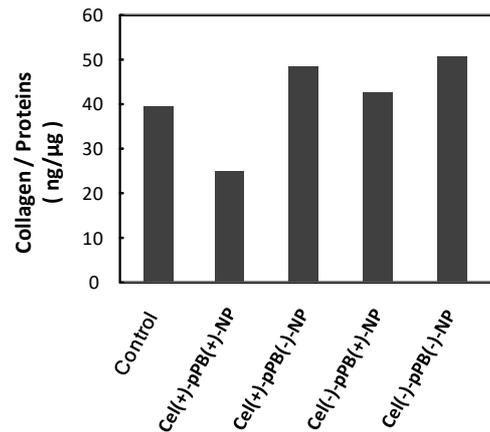


図 3. セレコキシブ封入ナノ粒子によるコラーゲン産生抑制

- 1) Kaneko K, and Ishihara T. Development of liver-specific ribavirin-loaded nanoparticles with reduced cytotoxicity, Cogent Medicine 4(1), 1418133, 2017