

DDS 医薬の創製

石原 務
日大工・生命

【緒論】

将来迎えるであろう超高齢化社会では、健康寿命を延伸することが重要な課題である。そのためには、健康管理/疾病予防はもちろん疾病発症後でも患者の生活の質を向上させる必要がある。薬物療法の一つであるドラッグデリバリーシステム(DDS)の技術を利用すると、体内の病変部位にのみ薬物を届け副作用を軽減させたり、一度の投与で薬効を長期間持続させ入院の回避や通院頻度の低下を可能にする。そこで我々は、工学的な見地から「患者にやさしい DDS 医薬品」の開発を試みた。本報告では、i) 肝硬変治療のための薬物キャリア(ナノ粒子)、ii) ホスファチジルコリンを化学修飾したタンパク質製剤、iii) 慢性動脈閉塞症治療のための脂質ナノ粒子製剤、iv) 遺伝子治療のための機能性ポリ乳酸ナノ粒子の四つの創薬研究の成果を記した。

【肝硬変治療のためのナノ粒子製剤】

肝星細胞は、肝炎が慢性化すると活性化され過剰にコラーゲン線維を産生する。その結果、肝臓が線維化され肝硬変へと進行する。現在のところ肝硬変の根治療法はないが、動物試験ではコラーゲン産生を抑制すると肝硬変の病態が改善されたとの報告がある。抗線維化効果が示唆されている薬物としてセレコキシブなどがあげられるが、全身に分布してしまい肝星細胞にのみ集積させることはできない。そこで本研究では、肝星細胞へ特異的に薬物を運搬できるナノ粒子型 DDS 製剤の開発を目的とした。肝星細胞に発現している血小板由来増殖因子受容体(PDGF 受容体)のリ

ガンド分子である環状ペプチド(pPB)をナノ粒子の表面に修飾した。また、ナノ粒子のコア部に生分解性高分子を用い長期薬効持続のための薬物徐放機能を付与した(図1)。

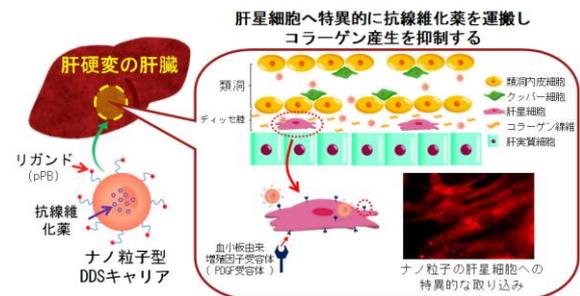


図1 肝星細胞への特異的薬物デリバリー

蛍光修飾ナノ粒子を作製しその TWNT-1 細胞(ヒト不死化肝星細胞株)への取り込み評価を行ったところ、pPB を修飾していないナノ粒子に比べ、pPB 修飾ナノ粒子では顕著に取り込まれた。また、その取り込みは過剰の pPB により抑制された。次に、セレコキシブにより誘導される TWNT-1 細胞の細胞死を評価したところ、pPB 未修飾ナノ粒子では細胞死がみられなかったが、pPB 修飾ナノ粒子では細胞死が確認できた。これは、ナノ粒子が pPB を介し選択的に細胞内に取り込まれセレコキシブを放出したためと考えられる。そこでさらに、TWNT-1 細胞のコラーゲン産生量を測定したところ、pPB 修飾ナノ粒子でのみコラーゲン産生が抑制された。よって、細胞内へ送達するセレコキシブ量を調整することで、細胞死を誘導せずコラーゲン産生を抑制できることがわかった。以上から、pPB 修飾ナノ粒子は肝星細胞へ特異的に抗線維化薬を運搬しコラーゲン産生を抑制できるキャリアとして期待できる。

【ホスファチジルコリンを化学修飾したタンパク質製剤】

近年、タンパク質を有効成分としたバイオ医薬品が数多く開発されている。その中には、遺伝子工学的あるいは化学的な修飾を施したものが存在する。現在、ホスファチジルコリン(PC)を修飾剤として用いたスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)製剤が研究されている。これまでに、PC化したSOD(PC-SOD)では、細胞親和性と血中滞留性が增大することや、活性酸素の過剰発現を起因とする様々な疾患モデル動物で薬理活性が高まることが報告されている。しかしながら、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。そこで、本研究ではPC-SODの生体成分との相互作用や *in vitro* での活性酸素消去能を検討した。

Cu, Zn-SOD に蛍光色素をラベル後、活性エステルを有するPC誘導体を反応させPC-SODをえた。電気泳動による解析の結果、PC-SODは血清中のアルブミンなどと複合体を形成することがわかった。また、PC-SODはSODより細胞に顕著に取り込まれ、阻害試験からその経路が脂質ラフトを介したエンドサイトーシスであることが示唆された。PC-SODの O_2^- 消去能を解析したところ、PC-SODはSODの約17%の消去能しかないことがわかった。さらに、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 O_2^- の定量を行った。培地中にSODあるいはPC-SODを添加し測定したところ、SODとPC-SODはほぼ同等の消去能を示した。一方、細胞とSODあるいはPC-SODをインキュベート後細胞を洗浄し測定したところ、SODはほとんど O_2^- を消去しなかったがPC-SODでは濃度依存的に顕著に消去できた。これは、細胞表面に結合したPC-SODが O_2^- を消去する役割を担ったためと考えられる。以上より、酵素活性が低下するにもかかわらずPC-SODがSODよりも高い薬理効果を示すのは、PC-SODが細

胞膜上に結合し細胞外に産生される O_2^- を効果的に消去したためと考えられる。

【慢性動脈閉塞症治療のための脂質ナノ粒子製剤】

リピッドエマルジョンとは、大豆油をレシチンで乳化した脂肪微粒子であり、血管拡張作用のあるプロスタグランジンE1(PGE1)のキャリアとして既に慢性動脈閉塞症治療で臨床利用されている。しかし、リピッドエマルジョンは薬物担持安定性が低く血中投与後すぐにPGE1が油相から遊離してしまう。一方、我々は既にポリ乳酸(PLA)からなるポリマーナノ粒子を開発してきた。このナノ粒子に封入した薬物は血中でほとんど遊離しないが、担持安定性が高すぎ疾患の種類によっては十分な薬効をえられないこともある。そこで本研究では、リピッドエマルジョンより安定に、かつポリマーナノ粒子より容易に薬物を放出できる新しい脂質ナノ粒子の開発を目指した(図2)。

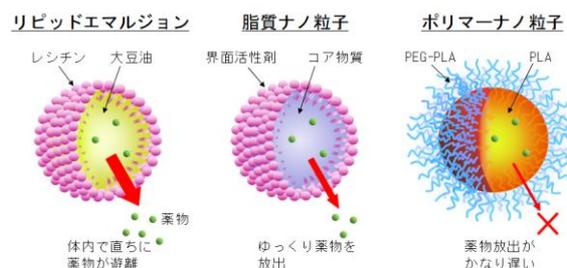


図2 様々な薬物放出速度の粒子製剤

ナノ粒子は、薬物としてPGE1のプロドラッグのAS013を、また界面活性剤として様々な両親媒性のブロック共重合体を用い溶媒留去法により調製した。しかしながら、50%血清中でのナノ粒子の薬物担持安定性は、ブロック共重合体の組成に依らずリピッドエマルジョンと大きな相違はみられなかった。そこで次に、トリラウリン、大豆油、PLAの3種のコア物質あるいはそれらを組み合わせて調製したナノ粒子の薬物担持安定性

を評価した。その結果、大豆油と PLA を混合した脂質ナノ粒子では、大豆油と PLA の混合比を変えることで薬物担持安定性を任意に制御できることがわかった。特に、約 20%重量の PLA を混合したナノ粒子は、リピッドエマルジョンとポリマーナノ粒子の中間の薬物担持安定性を示すことが明らかになった (図 3)。さらに、この脂質ナノ粒子をラットに静脈注射したところ、リピッドエマルジョンより高い血中滞留性を示した。

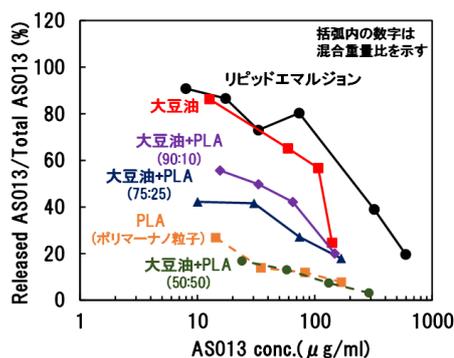


図 3 様々な粒子の ASO13 担持安定性

【遺伝子治療のための機能性ポリ乳酸ナノ粒子】

遺伝子治療の実現には、核酸分子を標的組織に集積させ効率よく細胞内の核や細胞質に運搬するキャリアが必要とされる。ポリエチレングリコール (PEG) 鎖で表面を被覆したキャリアは、血中投与後 EPR 効果により腫瘍組織や炎症部位に集積することが知られる。しかしながら、集積後は却って PEG 鎖の存在が細胞内への移行の妨げになってしまう。一方、エンドサイトーシスで細胞に取り込まれたキャリアは、エンドソームから細胞質内に核酸を運搬し遊離しなければならない。本研究では、これら二つの課題つまり「PEG ジレンマ」と「エンドソーム脱出」を克服すべく、PLA からなる機能性ナノ粒子の調製を試みた (図 4)。

PLA と PEG のブロック共重合体 (PLA-b-PEG) から調製したナノ粒子の細胞への取り込みを観察したところ、PEG 含量が多いナノ粒子ほど取り込

みは減少した。また、あらかじめナノ粒子を PBS 中でインキュベートした後細胞への取り込みを観察すると、インキュベート時間に依存し取り込みが増大した。これは、インキュベーションに伴い PLA-b-PEG の PLA が加水分解され PEG 鎖が粒子表面から遊離したためと考えられる。この結果は、時間依存的にナノ粒子の細胞への親和性を制御できることを示唆している。一方、PEG とポリグルタミン酸のグラフト共重合体 (PLG-g-PEG) あるいはブロック共重合体 (PLG-b-PEG) を血液に添加すると溶血がみられたことから、これら共重合体は膜破壊能を有していることがわかった。これらを修飾したナノ粒子の細胞内挙動を蛍光顕微鏡で観察したところ、PLG-g-PEG を用いたグラフト型ナノ粒子では、ややぼやけた蛍光が観察できた (図 4)。これは、エンドソーム内での PLA の加水分解に伴い、PLG-g-PEG がナノ粒子から遊離しエンドソーム膜を破壊したためと考えられる。

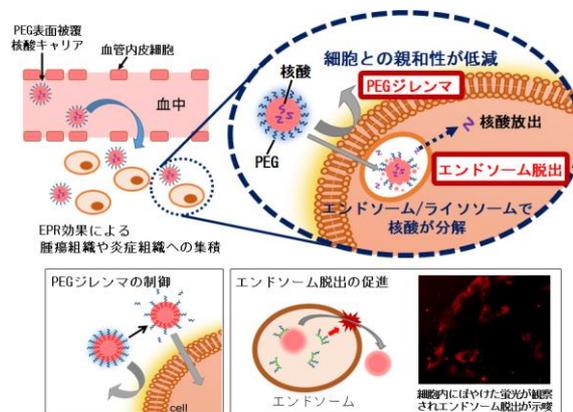


図 4 細胞質への核酸デリバリー