

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670079

研究課題名(和文) 血液型不適合生体肝移植時の抗体関連拒絶反応抑制を目指した薬物送達システムの開発

研究課題名(英文) Immunosuppression of anticancer agents containing PEGylated liposomes for liver transplantation.

研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：50325271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液型不適合肝移植において、超急性拒絶反応の主因となっている抗血液型抗体の誘導を抑制する事を目的に、抗がん剤を封入したリポソームの使用を提案した。実際に抗がん剤封入PEG修飾リポソームをマウス腹腔内に投与したところ、腹腔内B細胞における取り込みが確認された。さらに腹腔内B細胞へのリポソーム取り込みをより向上させるために血液型抗原で表面を修飾すると顕著に取り込み率が向上することが明らかとなった。しかしながら、抗がん剤封入PEG修飾リポソームを複数回投与しても抗血液型抗体の分泌を顕著に抑制することはできなかったことから、さらなる改良と検討を行う必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have studied the issue of if a spontaneous tolerance of B cells responding to blood group antigens frequently could be induced in ABO-incompatible pediatric liver transplantation by intraperitoneal injection of anticancer agent containing PEGylated liposomes. Here, we evaluated the role of peritoneal B-1 cells in the induction of blood group antigen (BGA)-reactive IgM in mice. We found that peritoneal B-1 cells bound to and then took up PEGylated liposomes i.p. injected. The surface modification of PEGylated liposomes with BGA further induced the uptake of PEGylated liposomes by peritoneal B-1 cells. However, unfortunately, the intraperitoneal injection of BGA modified PEGylated liposomes containing anticancer agent failed to tolerance of B cells responding to ABO-blood group antigens in LT.

研究分野：薬剤学

キーワード：血液型不適合肝移植 抗血液型抗体 PEG修飾リポソーム 抗がん剤

## 1. 研究開始当初の背景

血液型不適合移植は、脳死移植が主な欧米では合併症の高さと成績の低さから緊急避難的手段となっている。しかし、本邦では脳死臓器提供が少ないため生体肝移植が主であり、生体臓器提供者は近親者に限られるため血液型が不適合となる頻度が高い。血液型不適合肝移植では通常の臓器移植に見られる細胞性免疫拒絶に加えて、抗血液型抗体による液性免疫拒絶が問題となっている。これらの免疫拒絶が生じた場合、臓器移植直後から抗体依存的な細胞傷害により肝壊死に陥る場合や、あるいは術後 2~3 カ月で胆管炎を繰り返しつつ半年から数年かけて肝不全に陥るなど、極めて重篤な結果を生じることが知られている。この免疫拒絶に関わる血液型抗原は血球や移植臓器の血管内皮細胞に発現しており、免疫学的には T 細胞非依存性抗原(TI 抗原)に分類されている。

当研究室では TI 抗原である PEG 修飾リポソームに対し、脾臓辺縁帯に局在する MZ-B 細胞や腹腔内に多く存在する B-1 細胞が特異的に反応し PEG に対する抗体を分泌するだけでなく、これらの細胞が PEG 修飾リポソームを積極的に貪食するという事を明らかにしている。申請者らはこれまでに、抗がん剤であるドキソルビシンを封入した PEG 修飾リポソームを投与すると、脾臓の MZ-B 細胞がこれを貪食することで死滅し、抗 PEG 抗体分泌が抑制される現象を報告している。そしてこの現象は腹腔内の B-1 細胞においても同様に生じていると考えられている。

本現象を利用すれば、TI 抗原に反応性を有する B-1 細胞を特異的に除去することができるため、他の免疫抑制剤において生じる血液障害や、非特異的な免疫抑制による日和見感染などのリスクを増大させることなく血液型不適合臓器抗体分泌を抑制することが可能であり、従来の免疫抑制剤に代わる非常に有用なものになることが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究では、血液型不適合肝移植において、超急性拒絶反応の主因となっている抗血液型抗体の誘導を抑制する事を目的に、抗がん剤を封入したリポソームの使用を提案した。本提案は抗血液型抗体の主要な分泌細胞である腹腔内 B-1 細胞が TI 抗原である PEG 修飾リポソームを認識して取り込むという、我々が新規に発見した現象を利用したものである。これによって特異的に血液型抗原に対する免疫反応を選択的に抑制することで、血液型不適合生体肝移植の成績向上とレシピエントの QOL を向上させる事が期待できる可能性が高い。また、また、今回使用したドキソルビシン封入 PEG 修飾リポソームは既に DOXIL®として臨床で使用されていることから、副作用の予測や回避方法がある程

度判明している。さらにリポソーム化による副作用の低減が期待できるため、通常の免疫抑制剤の使用で生じるような血液障害などの副作用は生じにくいと考えられ、従来の免疫抑制療法に代わる新規治療法になることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) PEG 修飾リポソームの調製

HEPC/Cholesterol/mPEG2000-DSPE=1.85/1/0.15 (モル比)から構成される、粒子径約 100 nm の空の PEG 修飾リポソームを Bangham 法により調製した。また、A 型血液型抗原(Blood group A antigen)修飾リポソームは HEPC/Cholesterol/Blood group A type 2 tetrasaccharide NGL =1.85/1/0.15 (モル比)となるように調整した。リポソームの粒子径は約 100nm となるように調整した。ドキソルビシンの封入はリモートローディング法により行い、ドキソルビシンの封入率が 98%以上であることを確認した。

### (2)腹腔内細胞によるリポソームの取り込み評価

空の PEG 修飾リポソームをマウスに腹腔内投与した 1 日後に腹腔内細胞を回収し、細胞懸濁液を調製後、リポソームを取り込んだ細胞の割合を、フローサイトメーターを用いて測定した。また、得られた細胞を FITC 標識 anti IgM 抗体を用いて染色し、フローサイトメーターを用いて B 細胞におけるリポソームの取り込み量を評価した。

### (3)ヒト A 型赤血球を用いた免疫

成人男性より採取した血液を遠心し、赤血球層上部に生じるパフィーコートを除去することにより赤血球を分離した。分離した赤血球を  $1 \times 10^8$  cells/ml の濃度に調整し、マウスの腹腔内に 1ml 注入して免疫した。免疫後 1 週間の時点にてマウスより採血を行い、得られた血清中に含まれる抗血液型抗体量を、ELISA を用いて測定した。

### (4)抗がん剤封入リポソームによる免疫抑制作用及び毒性の評価

ドキソルビシン封入リポソームをマウスに 5mg/kg の投与量で週一回、合計三週間投与後、ヒト A 型赤血球を用いて免疫を行った。また、毒性の評価のためにマウスの体重を三日毎に測定し、同時に毛並や体動についても観察した。

## 4. 研究成果

### (1)腹腔内細胞におけるリポソームの取り込みに関する検討

まず、マウス腹腔内に DiI 標識したリポソームを投与し、腹腔内細胞におけるリポソームの取り込み量を、フローサイトメーターを用いて検討した。本検討に用いたのは通常の PEG 修飾リポソーム(PL)の他に、血液型抗体を分泌する B 細胞に対する選択性を高めるた

めに表面を血液型抗原で修飾した Blood group A 修飾リポソーム(BGA-ML)及び PEG を添加していないリポソーム(CL)である。それぞれのリポソームをマウス腹腔内に投与し、1 日後における腹腔内細胞による取り込み量を測定したところ、PL、CL、BGA-ML の順で取り込み量が増大していることが確認された。このように PL で取り込み量が最も少なくなった要因としてはマクロファージをはじめとする貪食細胞が、リポソーム表面に存在する PEG の影響によりリポソームを認識することができなかつたためであると考えられる。一方で BGA-ML の取り込み量が増大した要因としては、血液型抗原の本体である糖鎖が貪食細胞表面の TLR をはじめとした糖鎖を認識するリガンドに結合することが原因で細胞内に取り込まれやすくなったためであると推測される。

続いて B 細胞を FITC 標識 anti IgM 抗体で染色し B 細胞集団におけるリポソームの取り込み量を観察したところ、いずれの群においても顕著な差は見られなかつた。前述の結果と合わせて、リポソームを PEG 修飾すると、マクロファージなどの貪食細胞には取り込まれにくくなるが、B 細胞における取り込みには影響を与えないということが明らかとなった。これより、リポソーム表面の PEG 修飾は腹腔内 B 細胞に対する選択性を高めることができ、TI 抗原選択的な免疫抑制を達成するために利用できる可能性が高いことが示唆された。

## (2)抗がん剤封入リポソーム投与による毒性に関する検討

マウスに抗がん剤であるドキソルビシンを封入した各種リポソームを、1 週間に 1 回、5mg/kg の投与量で合計 3 週間腹腔内投与した際の毒性をマウスの体重の変化により評価した。当研究室のこれまでの検討で、この投与量で抗がん剤封入リポソームを投与した場合、脾臓に存在する TI 抗原反応性の MZ-B 細胞が死滅することが明らかとなっていることから、腹腔内細胞においても同様の現象が生じると推測される。抗がん剤封入リポソームを投与した際に体重減少をはじめとした副作用が生じなければ、副作用の少ない安全な免疫抑制剤としての利用が大いに期待できる。

その結果、ドキソルビシン封入 PL、CL、Blood group A 修飾リポソーム投与群のいずれにおいても体重減少は見られず、毛並の変化や体動の減少などの目立った副作用は観察されなかつた。これは抗がん剤がリポソーム内に封入されたことにより、非特異的に生体内に分布するのを抑制されたためであると考えられる。この結果から、B 細胞に傷害を与える投与量で抗がん剤封入リポソームを投与しても、顕著な副作用は発現しないことが明らかとなり、临床上問題となると予想される全身性の副作用は生じにくい可能性が高いことが示唆された。

## (3)抗がん剤封入リポソームによる免疫抑制作用に関する検討

抗がん剤封入リポソームによる免疫抑制作用について検討するために、マウスにドキソルビシン封入 PL 及び BGA-ML、CL を 1 週間に 1 回、5mg/kg の投与量で合計 3 週間腹腔内投与した後にヒト赤血球で免疫し、抗血液型抗体の分泌量を測定した。その結果、いずれの群もドキソルビシン封入リポソームを投与していない群と比較し、有意に抗体分泌を抑制することは出来なかつた。そこで、ドキソルビシンとは異なる作用機序を持つ抗がん剤であるオキサリプラチンを封入したリポソームを投与して同様の実験を行ったものの、抗血液型抗体分泌を抑制することは出来なかつた。

今回、抗血液型抗体分泌が抑制できなかつた原因は腹腔内の B-1 細胞を除去するのに十分な量のリポソームを投与できていなかつたためであると考えている。本検討では、1 週間に 1 回、合計 3 回抗がん剤封入リポソームを投与した。通常この投与量及び投与間隔でリポソームを投与した場合、脾臓に存在する TI 抗原反応性の MZ-B 細胞はほぼ完全に除去できることが当研究室の検討で明らかになっている。一方で腹腔内 B-1 細胞は、他の B 細胞集団とは異なる性質を有しており、その中の 1 つに、腹腔内において自己増殖することが挙げられる。そのため、今回検討を行った投与間隔で除去しきれずに残った B-1 細胞が腹腔内にて再増殖し、抗体を分泌した可能性は否定できない。また、リポソームを腹腔内に投与した場合、大部分は腹腔内にとどまらずに数時間以内に血中に移行することが申請者らの研究で明らかになっている。今回の検討では、リポソームが腹腔内に短い時間しか滞留しなかつたために、腹腔内細胞を除去しきれなかつた可能性があるため、より長時間リポソームを腹腔内に滞留させる工夫をすることで、腹腔内細胞へリポソームの移行を向上できると考えられる。

本検討では残念ながら抗血液型抗体の分泌を抑制することは出来なかつたが、PEG 修飾リポソームが腹腔内 B-1 細胞に取り込まれることや、生体に対する毒性を生じにくいことが明らかとなったため、今後腹腔内における滞留性や表面修飾など改良を加えることにより、安全で有効性の高い免疫抑制剤として利用できる可能性は高い。

## 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

Mima, Y., Hashimoto, Y., Shimizu, T.,

Kiwada, H., Ishida, T., Anti-PEG IgM is a major contributor to the accelerated blood

clearance of polyethylene glycol-conjugated protein. Mol. Pharmaceut., 査読有, 12, 2015, 2429–2435

DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00144.

Kawanishi, M., Hashimoto, Y., Shimizu, T., Sagawa, I., Ishida, T., Kiwada, H.,

Comprehensive analysis of PEGylated liposome-associated proteins relating to the accelerated blood clearance phenomenon by combination with shotgun analysis and conventional methods. Biotech. Appl.

Biochem., 査読有, 2015, 62, 547-555

DOI: 10.1002/bab.1291.

〔学会発表〕(計5件)

清水太郎、石田竜弘、他、FTY720 併用によるドキシルの細胞内取り込み向上に関する検討、第37回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、熊本大学薬学部(熊本県・熊本市)、2015年11月20日

吉岡千尋、石田竜弘、他、ヒドロキシ末端 PEG 修飾リポソームを用いた静注型ワクチン開発に関する基礎的研究、第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、高知テルサ(高知県・高知市)、2015年10月31日

石田竜弘、PEG 修飾製剤に対する免疫応答～抗 PEG-IgM の分泌誘導～、第5回薬剤学セミナー、熊本大学薬学部(熊本県・熊本市)、2015年7月21日

川西宗平、石田竜弘、他、Shotgun 分析を用いた PEG 修飾リポソーム結合タンパク質の網羅的解析、第23回DDSカンファランス、清水テルサ(静岡県・静岡市)、2014年9月5日

阿部遼、石田竜弘、他、PEG 修飾リポソームの投与経路の違いが anti-PEG IgM 分泌に及ぼす影響に関する検討(第2報)、第23回DDSカンファランス、清水テルサ(静岡県・静岡市)、2014年9月5日

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 竜弘 (ISHIDA, Tatsuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：50325271