

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号： 32620  
研究種目： 奨励研究  
研究期間： 2020～2020  
課題番号： 20H01095  
研究課題名 パーキンソン病の治療を目指した新規薬物封入型イムノリポソームの創製

## 研究代表者

濱道 修生 (Hamamichi, Shusei)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・研究支援者

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 480,000円

研究成果の概要：パーキンソン病治療においてL-DOPAは有効であるが、副作用が報告されている。そこで我々は血液脳関門を介して標的細胞への薬物送達を目指し、新規モダリティの開発を試みた。その実現には内在化活性を有する抗体が必要であるため、まずハイブリドーマライブラリーを作製し、214D8抗体の取得に成功した。次に214D8抗体を薬物送達キャリアであるリポソームに架橋し、作製された214D8架橋イムノリポソームの機能解析を行なった結果、抗原抗体反応による細胞内取込みや薬物送達が認められた。標的細胞への薬物送達を目指す上で、これらの研究成果は新規モダリティの実用化に向けて大いに期待できる結果と考える。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

L-DOPAは運動症状の改善に有効であるが、パーキンソン病の完治には不十分である。さらにL-DOPAによる消化器系や循環器系の副作用が報告されている。そこで我々は副作用の軽減には標的細胞への特異的な薬物送達が極めて重要であると鑑みて、血液脳関門を介して標的細胞への薬物送達を目指し、新規薬物封入型イムノリポソームの創製を試みた。リポソームの特徴的利点は水溶性や脂溶性薬物の封入である。さらに複数の機能性抗体の架橋により更なる拡張性が見込められる。超高齢化社会となり神経変性疾患の患者数は増加の一方であるが、根治療法は未だにない。新規モダリティの開発は症状改善を目指す上で、意義のある試みである。

研究分野：腫瘍学、ブレインサイエンスおよびその関連分野

キーワード：イムノリポソーム 抗体 薬物送達システム パーキンソン病 CD71 トランスフェリンレセプター  
イムノトキシン 内在化活性

## 1. 研究の目的

### (1) 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (PD) は 65 歳以上の人口の 2-3% が罹患する 2 番目に患者数の多い神経変性疾患である。主な症状として運動障害 (振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害) や非運動症状 (記憶障害、睡眠障害、嗅覚低下等) が知られており、神経病理学的解析から中脳にある黒質神経細胞の減少と機能低下に伴う線条体のドーパミン欠損が報告されている。黒質神経細胞の神経変性のメカニズムは未だ不明であるが、タンパク質の恒常性低下、ミトコンドリアの機能不全、カルシウムの恒常性不全、酸化ストレス、軸索輸送並びに神経炎症などが関連すると指摘されている。運動障害の発症時において、線条体のドーパミンは正常時の約 1/10 まで減少するため、ドーパミンの補充を試みるドーパミン補充療法を中心に PD 治療を目指した創薬研究や治療開発が進められてきた。代表的な成功例である L-DOPA はドーパミンの前駆体であり、血液脳関門 (BBB) を通過できる性質を持つ。L-DOPA は運動障害の改善に有効であるが、PD の完治には不十分である。さらに L-DOPA は末梢においても代謝されるため、消化器系や循環器系の副作用が報告されている。そこで我々は副作用の軽減には標的細胞への特異的な薬物送達を極めて重要であると鑑みて、BBB を介して標的細胞への薬物送達を目指し、新規薬物封入型イムノリポソームの創製を試みた。

### (2) 研究の目的

本研究課題の目的は BBB を通過して中枢神経系へ薬物送達できる新規モダリティの開発である。これまでの PD 創薬研究において、治療薬の BBB 通過や脳内集積の性質が利用されてきた。その代表例が L-DOPA であり、PD における薬物療法の進展に大きく貢献した。すなわち PD 薬物療法を成功させるためには、血中薬物の BBB 通過と中枢神経系への薬物到達が極めて重要である。そこで我々は上記を達成するため、細胞内へと内在化される抗体を得るスクリーニング技術を既に開発しており、BBB 通過が期待できる抗体を取得する。内在化活性を有する抗体が BBB を通過したとしても、薬効に関してはターゲット部位に十分な薬物集積が必要である。そこで我々は薬物送達システムであるリポソームに内在化活性を有する抗体を架橋し、イムノリポソームとして上記の達成を図る。超高齢化社会となり神経変性疾患の患者数は増加の一方であるが、根治療法は未だにない。我々は新規薬物封入型イムノリポソームを開発し、PD 症状の改善を目指した。

## 2. 研究成果

### (1) 研究の方法：214D8 ハイブリドーマの樹立と 214D8 抗体の評価

細胞内へと内在化される抗体を取得するため、Balb/c マウスに U87 細胞を免疫し、脾臓細胞とミエロマ細胞を融合した後、ハイブリドーマライブラリーを作製した。このライブラリーの上清を用いて、イムノトキシンスクリーニングを行い、内在化活性を有する抗体を分泌するハイブリドーマを解析した。細胞増殖は WST-1 アッセイを用いて検討した。限界希釈法によりハイブリドーマをクローニングし、目的のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを樹立した。さらにモノクローナル抗体のアイソタイピングを行なった。

抗体の性質を理解する上で抗原の同定は重要であるため、まず 214D8 抗体を精製し、この抗体の抗原を免疫沈降並びにイムノプロットング、フローサイトメトリーやサンドイッチ ELISA を用いて検討した。これらの実験結果から 214D8 抗体の抗原がヒト CD71/TFRC であることが強く示唆された。

この抗体の特性はフローサイトメトリーや免疫細胞染色により主に A172、U87、SH-SY5Y と H4 細胞を用いて評価した。さらに 214D8 抗体単独或いはイムノトキシンとして、内在化活性と細胞毒性の誘導を検討した。細胞増殖は WST-1 アッセイを用いて解析した。

### (2) 研究の方法：214D8 架橋イムノリポソームの作製とイムノリポソームの機能解析

214D8 抗体を薬物送達キャリアであるリポソーム (粒子径: 約 100 nm) に架橋し、作製された 214D8 架橋イムノリポソーム (214D8 ILP) の組成と物性を解析した。組成はリン脂質定量とタンパク質定量から明らかにした。粒子径は Nanosight LM10、ゼータ電位は Zetasizer Nano、形状は透過電子顕微鏡 HT7700 を用いて解析した。214D8 ILP の抗原抗体反応はフローサイトメトリーを用いて確認した。K<sub>D</sub> 値は LigandTracer を用いて検討した。

細胞内取込み機能を検討するため、蛍光色素 DiOC<sub>18</sub>(3) を内包した 214D8 ILP 等を作製した。これら DiOC<sub>18</sub>(3) を内包したイムノリポソームを A172 細胞へ添加し、蛍光イメージングによる細胞内取込みのキネティクスを IncuCyte ZOOM を用いて解析した。

薬物封入の有効性を検討するため、ドキシソルピシンが内包された 214D8 ILP 等を作製した。これらドキシソルピシンを内包したイムノリポソームを A172 細胞に添加し、細胞へのデリバリー特性を解析した。細胞生存率は WST-1 アッセイを用いて検討した。ドキシソルピシンの定量は分光光度計 (495 nm) や UPLC を用いて分析した。

### (3) 研究成果：214D8 ハイブリドーマの樹立と214D8 抗体の評価

本研究課題の目的を達成する新規モダリティがBBBを通過(トランスサイトーシス)するためには内在化活性を有する抗体が必要である。そこでBalb/cマウスにU87細胞を免疫し、脾臓細胞とミエローマ細胞を融合した後、ハイブリドーマライブラリーを作製した。384ウェル中312ウィル(81%)にハイブリドーマが含まれていた。抗体の内在化活性はイムノトキシンを用いて評価した。すなわちハイブリドーマ上清に含まれる抗体とトキシン(DT3C)が結合し、イムノトキシンが内在化された場合だけ、U87細胞の細胞毒性が誘導される原理である。これに基づきイムノトキシンスクリーニングを実施した結果、214D8ハイブリドーマは内在化活性を有する抗体を分泌することが分かった。このハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングし、214D8ハイブリドーマの樹立に成功した。さらに214D8モノクローナル抗体のアイソタイプピングを行い、IgG1 kappaであることが判明した。

214D8抗体を精製した後、この抗体の抗原を検討した。A172細胞等の表面タンパク質をビオチン化し、免疫沈降並びにイムノプロットングを実施した結果、約98kDaのバンドが検出された。次にフローサイトメトリーを用いて、ヒトCD71/TFRC-OFDを過剰発現したCHO細胞を解析し、214D8抗体とヒトCD71-OFD CHO細胞の免疫反応が認められた。さらに214D8抗体の抗原を解析するため、組換えヒトCD71タンパク質を用いて免疫沈降及びイムノプロットングを行った結果、組換えヒトCD71タンパク質を示す約77kDaのバンドが検出された。サンドイッチELISAを実施しても、214D8抗体と組換えヒトCD71タンパク質の免疫反応が確認された。これらの結果から214D8抗体の抗原がヒトCD71/TFRCであることが強く示唆された。

この抗体の特性はまずフローサイトメトリーや免疫細胞染色により主にA172、U87、SH-SY5YとH4細胞を用いて評価した。214D8抗体はA172(MFI:285)、U87(MFI:147)とSH-SY5Y(MFI:73.2)に対して強い免疫反応を示した一方、H4(MFI:81.3)には弱い免疫反応を示した。214D8抗体を用いた免疫細胞染色においては細胞膜並びに細胞内に発現されるタンパク質が染色された。さらに抗体の特性を検討するため、214D8抗体をA172、U87、SH-SY5YとH4に添加した結果、抗体単独では細胞毒性が誘導されなかった。その一方、内在化活性を検討するため、イムノトキシンとして214D8抗体を評価した場合、LogEC<sub>50</sub>(ng/well)は6.86(A172)、4.27(U87)、2.86(SH-SY5Y)と24.65(H4)であった。これら上述した結果はポジティブコントロールとして用いた抗ヒトCD71抗体と比較しても同様であった。

### (4) 研究成果：214D8 架橋イムノリポソームの作製とイムノリポソームの機能解析

214D8抗体を薬物送達キャリアであるリポソームに架橋し、作製された214D8ILPの物性評価(粒子径、ゼータ電位、形状等)を行った。抗体を架橋してないリポソームと比較した際、214D8ILPの粒子径はわずかに大きく、ゼータ電位もわずかに上がった。リポソームに架橋された214D8抗体の架橋率は60%であった。抗原抗体反応はフローサイトメトリーを用いて確認し、214D8ILPとA172細胞の免疫反応が認められた。さらにLigandTracer解析から214D8ILPのK<sub>D</sub>値が58.1nMであることが分かった。

イムノリポソームの機能解析においては、214D8ILP等に蛍光色素DiOC<sub>18</sub>(3)を内包し、A172細胞へ添加した後、蛍光イメージングによる細胞内取込みのキネティクスを解析した。リン脂質量として10μMの214D8ILPは、抗原抗体反応依存的にA172細胞に取込まれた。さらにコントロールと比較した場合、214D8ILPは最大2.21倍(添加66時間後)細胞内に取込まれた。これらの結果から、214D8ILPを用いることにより抗原抗体反応による細胞内取込みの増加が示された。

さらに薬物封入の有効性を検証するため、まずドキシソルピシンが内包された214D8ILP等を作製し、A172細胞に添加した後、細胞へのデリバリー特性を解析した。リン脂質量として100μMの214D8ILPを1時間処理した場合、コントロールと比較して細胞生存率が31%低下した。これはドキシソルピシンが細胞内へ取込まれたため、細胞生存率が低下したと考えられる。これらの結果から、ドキシソルピシンを内包した214D8ILPを用いることにより抗原抗体反応による細胞への薬物送達認められた。さらに定量分析からドキシソルピシンが内包された214D8ILPの組成は119μgドキシソルピシン/16μg214D8抗体/1μmolリン脂質であることが分かった。リポソームに封入されたドキシソルピシンの封入率は44%であった。

### (5) 結論

我々はBBB通過と中枢神経系への薬物集積に着目し、新規モダリティの開発を試みた。BBB通過が期待できる214D8抗体(抗ヒトCD71/TFRC抗体)を生産する214D8ハイブリドーマを樹立し、上記を達成した。中枢神経系への十分な薬物集積が必要になるため、リポソームに214D8抗体を架橋し、214D8ILPとして機能解析を実施した。抗原抗体反応による細胞内取込みや薬物送達認められたことから上記の達成にも期待できる。リポソームの特徴的利点として水溶性や脂溶性薬物の封入があげられる。さらに214D8抗体以外の機能性抗体の架橋により更なる拡張性が見込める。標的細胞への薬物送達を目指す上で、これらの研究成果は新規モダリティの実用化に向けて大いに期待できる結果と考える。

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hamamichi Shusei、Fukuhara Takeshi、Umeda Izumi O.、Fujii Hirofumi、Hattori Nobutaka	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel method for screening functional antibody with comprehensive analysis of its immunoliposome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84043-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------