

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15111

研究課題名(和文) 近未来のDDSを拓くりポソーム人工抗体の創作と敗血症治療への応用

研究課題名(英文) Development of liposomal plastic antibody for novel DDS and application for sepsis treatment

研究代表者

奥 直人 (Oku, Naoto)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10167322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：血流中に入った毒素の中和は、種々の疾患治療につながる。抗体は体内毒素の中和に用いられてきたが、調製面や安定性に問題がある。一方、最適な官能基を有するモノマーから合成されるプラスチック抗体は、多くの利点を有する反面、血中滞留性や標的中和活性等に問題がある。本研究では、標的中和活性を有する直鎖のポリマーをリポソーム表面に直接修飾することで、リポソーム膜の流動性とポリマーの柔軟性を利用した標的タンパク質との結合を可能とすることを考えた。またこのコンセプトを証明するために、「敗血症」の原因となるヒストンを中和するリポソーム抗体を創製し、その有用性を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Neutralization of toxins which entered into bloodstream, is important for curing several disorders. The gold standard to neutralize macromolecular toxins is antibodies, even though they have several problems such as high cost for preparation, and biological and chemical instability. On the other hand, plastic antibodies synthesized with monomers having appropriate functional groups may substitute with antibodies. Although they also have several problems such as short blood circulation time and not so high target-neutralizing activity.

By the way, decoration with polymer ligands (PLs) on liposomal membrane, enables appropriate interaction between PLs and target toxins through the lateral diffusion of PLs on the membrane. For obtaining the proof of concept, we used histones, major mediators of sepsis, as model toxins in the present study, and the results of our study suggested that abiotic PLs on the lipid nanoparticles can be useful for capturing and neutralizing target toxins.

研究分野：薬物送達学

キーワード：リポソーム ノンインプリント人工抗体 プラスチック抗体 敗血症 ヒストン 毒素の中和 膜流動性

1. 研究開始当初の背景

蛇毒などの毒素タンパク質が生体に侵入した場合に、抗血清により毒素を中和する治療法が従来から用いられてきた。一方、感染症を契機に全身の臓器が急激に傷害を受ける「敗血症」は3人に1人が死亡すると言われる。早期治療により死亡率を減らすことが重要である。敗血症は、好中球のNETosisによりヒストンが血流中に放出され、毒素として働くことが主な原因である。外毒素や敗血症により放出されたヒストンを速やかに中和するためには、血液中でこれらの毒素タンパク質を認識・捕捉し、中和する解毒剤が必要である。現在解毒剤のゴールドスタンダードは抗体である。しかしながら、抗体は開発や調製コストが高く、医薬品として用いる場合に患者の治療費負担増や、国の医療財政を圧迫する要因となっている。

ところで、標的分子の種々のエピトープを認識する特徴的な官能基を有するモノマーを架橋して得られるインプリントプラスチック抗体は、標的分子全体を包み込むようにポリマーが結合するために、限られたエピトープを認識する抗体とは異なる様式で標的分子に結合し、中和活性を示す。しかしながらインプリント抗体は、調製が煩雑で大量生産はできない。一方、種々のモノマーを標的認識に最適な割合で配合することにより調製したノンインプリントプラスチック抗体は、多方面から標的タンパク質と結合することにより、標的分子を効率的に中和することを見出した。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109: 33, 2012)。本研究は、ノンインプリント抗体をさらに発展させ、リポソーム表面に種々の結合官能基を有する**リポソーム人工抗体**を創製するものである。

2. 研究の目的

特徴的な官能基を有するモノマーを架橋して得られるポリマー粒子“プラスチック抗体”は、標的と粒子中の個々の官能基との結合

は弱いものの、多方面から標的分子と結合することにより、強固な標的結合活性を示す。本研究では、プラスチック抗体のさらなる進化を目指して、血流中の毒素を中和する次世代型プラスチック抗体“**リポソーム人工抗体**”の開発を目的とした。リポソーム抗体では、直鎖ポリマーをリポソーム膜表面に配し、リポソーム膜の流動性とポリマーの柔軟性を利用した標的タンパク質との結合を可能としている。本研究では「敗血症」の原因となる血流中のヒストンを中和するリポソーム抗体を得ることにより、リポソーム抗体の有用性を実証し、合わせて敗血症治療に有効なリポソーム抗体の開発基盤を構築する。

標的タンパク質を多方面から包み込む形で結合するためには、ポリマー鎖の柔軟なコンフォメーション変化により、個々の官能基が最適な位置で標的タンパク質のエピトープを認識する必要がある。この仮説が正しければポリマー鎖を架橋したナノ粒子(nanoparticles, NPs)より、横方向に自由度がある人工膜平面上にポリマー鎖を配置する方が、標的の認識と強固な結合に好都合である。このリポソーム抗体においては、個々のポリマー鎖は標的分子の大きさを超える程度の長さであれば、十分と考えられる。リポソームはDDS ツールとして多くの研究がなされており、膜流動性やサイズの調製が容易で、血中滞留性をコントロールできるほか、免疫原性が見られないことや臨床応用されていることから、安全性等にも問題はない。

3. 研究の方法

【直鎖ポリマーの合成とリポソーム修飾】

標的分子への結合活性を付与する直鎖ポリマーは、モノマーとして *N*-isopropylacrylamide (NIPAm)を基盤とし、負電荷モノマー acrylic acid (AAc)と疎水性モノマー *N*-tert-butyl-acrylamide (TBAm)を用いた。これらを種々の配合比で混合し、可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合によって合成した。合成後、

トリフルオロ酢酸により *tert*-buthyl AAc を AAc に変換し、末端を SH 基とした。リポソームへの修飾は、リポソームにマレイミド脂質を組み込むことで行った。リポソームはジパルミトイルホスファチジルコリン、コレステロール(モル比 2 : 1)で構成し、ヒストン結合活性は quartz crystal microbalance (QCM) により測定した。この結合性を指標に、モノマーの最適配合比率、最適な鎖長等を明らかにした。

【リポソーム抗体のヒストン結合性】

ヒストンの細胞傷害活性を指標に、リポソーム抗体の中和活性をインビトロで評価した。毒素タンパク質による 2H-11 細胞増殖抑制作用、および細胞傷害作用を測定し、ポリマー修飾リポソームによる中和活性を評価した。細胞傷害作用に関しては乳酸脱水素酵素の細胞外への放出量により評価した。なおポリマー修飾リポソーム自体の細胞増殖抑制作用および細胞傷害作用についても評価した。

次にマウス血液中にヒストンを投与し、リポソーム抗体等による中和活性をインビボで評価した。またリポソーム抗体の体内動態等を明らかにした。ところで血液中には様々なタンパク質が存在している。そこで血液中含有量が多いアルブミン、イムノグロブリン、フィブリノーゲン等に対するリポソーム抗体の結合性を解析した。

【リポソーム抗体の体内動態解析】

[³H] Cholesteryl hexadecylether をリポソームに組み込むことで放射標識したリポソーム抗体を、マウス尾静脈から投与し、一定時間後にマウスの各臓器・組織の放射活性を測定した。

また放射標識 NIPAm を用いて直鎖ポリマーを合成することで放射標識ポリマーを調製し、リポソームに修飾されたポリマーの体内動態を測定した。コントロールとしては、リポソームに修飾していない直鎖ポリマーを用いた。

【リポソーム抗体によるヒストン中和活性】

上記研究成果を踏まえ、血流中におけるポリマー修飾リポソームとヒストンとの相互作用について解析した。具体的には Cy5 にて蛍光標識したヒストンをマウス尾静脈内から投与し、その後にポリマー修飾リポソームを尾静脈内投与した。そして蛍光標識ヒストンの体内分布の変化について In Vivo Imaging System を用いた解析を行った。また肝臓、脾臓等、各臓器・組織の組織切片を作製し、各臓器内におけるヒストンとリポソーム抗体の分布と局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

4 . 研究成果

	NIPAm	TBAAm	AAc
	55	40	5
	50	40	10
	40	40	20
	20	40	40

表 1 モノマーの比率

まずポリマーリガンド(PL)の合成を表 1 に示すモノマーの割合で行った。また RAFT 重合による PL の長さは、30 mer, 100 mer, 1000 mer とした。QCM を用いて PL-NP のヒストンに対する結合親和性を計測した結果を図 1 に示す。PL-NP とヒストンの強い結合には PL を構成する AAc の割合、及び PL の長さが重要であることが明らかになった。

次に、マウス内皮細胞を用いて PL-NP によるヒストン依存的な細胞傷害阻害効果を検討した結果、ヒストンに最も高い親和性を示した PL-NP 添加群が、有意にヒストン依存的な細胞傷害を阻害した (data not shown)。以上より、PL を構成するモノマー比とその長さを最適化することで、標的毒素であるヒストンに対して高い親和性を示し、毒性を中和可能であることが明らかになった。in vivo 治療効果の検討に向けて PL および PL-NP の体内動態を測定したところ、脂質ナノ粒子に修飾していない PL は、尾静脈内投与から 3 時間後

には殆ど血液中から消失していたのに対し、PL-NP は 35%以上が残存していた。

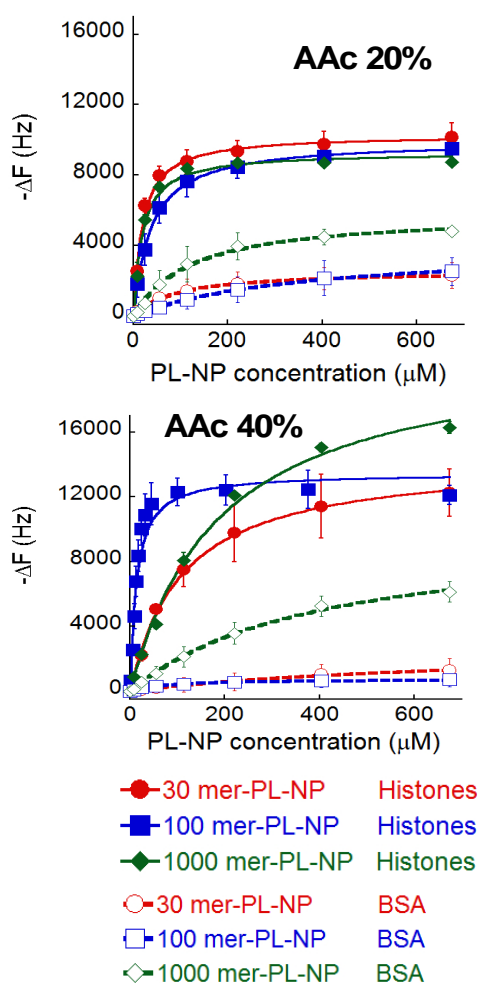


図 1 ヒストンへの結合に対するモノマーの組成と長さの影響

最後に、*in vivo*におけるヒストン中和能を明らかにするために、致死量のヒストンをマウス尾静脈内投与した後、*in vitro*にて最適化した PL-NP を尾静脈内投与した。すると、脂質ナノ粒子に修飾していない PL は、ヒスト

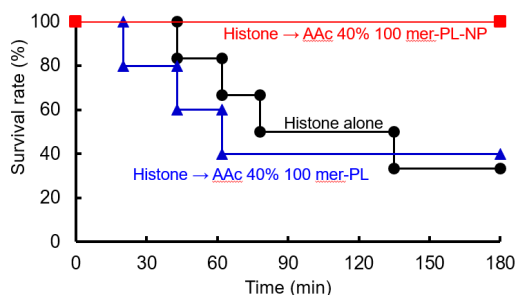


図 2 ヒストン毒性に対する PL の効果
5 - 6 匹のマウスにヒストンを尾静脈投与 (55 mg/kg) ●、またはその 20 秒後に PL(▲)または PL-NP(■)を投与

ンによるマウスの致死率を改善しなかったが、PL-NP を投与することで全てのマウスが生存した(図 2)。この結果から、PL-NP を用いることでマウス体内においてもヒストン毒性を中和可能であることが示された。

以上より、脂質ナノ粒子に PL を修飾した本手法が、細胞膜に親和性を示さない幅広い毒素の中和方法として有用な戦略となる可能性が示された。

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)

- 1) Koide H, Yoshimatsu K, Hoshino Y, Lee SH, Okajima A, Ariizumi S, Narita Y, Yonamine Y, Weisman AC, Nishimura Y, Oku N, Miura Y, Shea KJ: A polymer nanoparticle with engineered affinity for a vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅). *Nat Chem.* 9: 715-722 (2017).
- 2) Koide H, Tsuchida H, Nakamoto M, Okishima A, Ariizumi S, Kiyokawa C, Asai T, Hoshino Y, Oku N: Rational designing of an antidote nanoparticle decorated with abiotic polymer ligands for capturing and neutralizing target toxins. *J Control Release.* 268: 335-342 (2017).

[学会発表](計 15 件)

- 1) 土田大貴、小出裕之、仲本正彦、沖嶋杏奈、有泉早紀、清川千秋、星野友、奥直人: 生体内で標的毒素を中和する“リポソーム解毒剤”の開発: 第 10 回 QCM 研究会「QCM による分子間相互作用の測定」2016 年 8 月 26 日 (東京)
- 2) 土田大貴、小出裕之、仲本正彦、沖嶋杏奈、有泉早紀、清川千秋、星野友、奥直人: 生体内で標的毒素を中和する脂質ナノ粒子解毒剤“Nano-dotes”の開発: 第 25 回 DDS カンファレンス 2016 年 9 月 2 日 (静岡)
- 3) Tsuchida H, Koide H, Nakamoto M, Okishima A, Ariizumi S, Kiyokawa C, Asai T, Hoshino Y, Oku N: Multifunctional polymer-modified liposomes that capture and neutralize toxic protein, histones. International Conference on Nanomedicine and Nanobiotechnology 2016 年 9 月 29 日 (Paris)
- 4) Ariizumi S, Koide H, Shea KJ, Oku N:

- Development of Polymer Nanoparticles with Affinity to a Vascular Endothelial Growth Factor for Cancer Therapy 2016 AAPS Annual Meeting and Exposition. 2016年11月15日 (Denver)
- 5) 土田大貴、小出裕之、仲本正彦、沖嶋杏奈、有泉早紀、清川千秋、浅井知浩、星野友、奥直人：生体内で標的毒素を中和するポリマーリガンド修飾脂質ナノ粒子の開発：第38回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2016年11月17日(名古屋)
 - 6) Ariizumi S, Koide H, Hoshino Y, Miura Y, Shea KJ, Oku N: Cancer treatment with polymer nanoparticles having affinity to vascular endothelial growth factor: The 12th China-Japan Symposium on Health Sciences. 2017年2月10日 (杭州)
 - 7) 沖嶋杏奈、小出裕之、有泉早紀、清川千秋、土田大貴、香門悠里、星野友、Kenneth J. Shea、奥直人：生体内で標的分子を吸着するPEG修飾ポリマーナノ粒子の設計：日本薬学会第137年会 2017年3月26日 (仙台)
 - 8) 小出裕之、有泉早紀、星野友、三浦佳子、Kenneth J. Shea、奥直人：がん治療に向けたプラスチック人工抗体の開発：第81回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 2017年5月20日 (名古屋)
 - 9) 沖嶋杏奈、小出裕之、土田大貴、仲本正彦、星野友、奥直人：生体内で標的毒素を中和するポリマーリガンド修飾脂質ナノ粒子の開発第33回日本 DDS 学会学術集会 2017年7月6日 (京都)
 - 10) 小出裕之、有泉早紀、沖嶋杏奈、星野友、三浦佳子、Kenneth J. Shea、奥直人：VEGF を吸着し中和する多官能性合成ポリマーナノ粒子を用いたがん治療：第33回日本 DDS 学会学術集会 2017年7月7日 (京都)
 - 11) 小出裕之：標的高分子を吸着しその機能を中和する合成ポリマーナノ粒子の開発と難治性疾患治療への応用：第11回 QCM 研究会 2017年8月25日 (東京)
 - 12) 小出裕之、有泉早紀、星野友、三浦佳子、シェアケネス、奥直人：VEGF と結合して中和する多官能性ポリマーナノ粒子の開発とがん治療へ応用：第66回高分子討論会 2017年9月20日 (愛媛)
 - 13) Hayashi N, Koide H, Okishima A, Kamon Y, Hoshino Y, Shea KJ, Oku N:

Development of long-circulating polymer nanoparticles for sepsis treatment: AAPS Annual Meeting and Exposition. 2017年11月12日(San Diego)

- 14) Okishima A, Koide H, Hoshino Y, Egami H, Hamashima Y, Oku N: Development of synthetic polymer nanoparticles to adsorb indole for the treatment of renal failure. AAPS Annual Meeting and Exposition. 2017年11月12日(San Diego)
- 15) Koide H, Ariizumi s, Hoshino Y, Miura Y, Shea KJ, Oku N: Development of polymer nanoparticles with affinity to a vascular endothelial growth factor for cancer therapy. AAPS Annual Meeting and Exposition. 2017年11月12日(San Diego)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/radiobio/mbc/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥直人 (OKU, Naoto)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10167322

(2) 研究分担者

浅井 知浩 (ASAI, Tomohiro)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：00381731

(3) 研究分担者

清水 広介 (SHIMIZU, Kosuke)

浜松医科大学・学内共同利用施設等・准教授

研究者番号：30423841

(4) 研究分担者

小出 裕之 (KOIDE, Hiroyuki)

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：60729177