

機関番号：23803

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390014

研究課題名（和文） 逆標的化DDSを用いたアレルギー・免疫疾患治療法の開発

研究課題名（英文） A novel targeting DDS for the treatment of autoimmune diseases and allergy

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

研究成果の概要（和文）：花粉症などのアレルギー疾患では脱感作療法などが行われているが、根本的治療法はない。本研究では、アレルギーの基となる免疫細胞の活性を恒久的に抑える根本的治療法を開発する。すなわち薬物送達システムを利用し、特定の薬物を運ぶキャリアーに抗原を結合することで、抗体産生細胞に特異的にキャリアーを認識させ、特定の細胞のみに薬物を送達し細胞の活性を抑える新たな治療戦略を確立する。

研究成果の概要（英文）：Specific antigen-sensitized body has the antigen-specific immune cells, which recognize the antigen. The antigen-coupled carrier is recognized by the immune cells. When the carrier encapsulate certain drugs, these drugs are specifically delivered to the immune cells. This strategy would be useful for suppressing the activity of specific immune cells related allergy and other immune diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：薬物送達学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー、DDS、逆標的化、リポソーム、アレルギー、花粉症

## 1. 研究開始当初の背景

（1）薬剤を血中に投与し、目的の部位に到達させる薬物送達システム(DDS)として、全身性真菌症の治療薬AmBisomeが2006年に、また腫瘍における血管透過性亢進を利用した受動的ターゲティング製剤としてDoxilが2007年に相次いで我が国で認可され、DDS製剤の有用性が高まった。リポソームを用いるDDS製剤の開発に関して、我々は多くの経験と知識を有しており、免疫の分野でも卵白アルブミン(OVA)をモデル抗原として

内封したポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームを経口投与すると、リポソームの組成、サイズと抗体産生との間に関連性が見出されることを報告していた(*J. Control. Release*, 89, 189-197, 2003)。これまで多くの実践的な製剤開発基盤となる研究成果を報告してきたが、特に新生血管を標的とした腫瘍新生血管傷害療法(*Oncogene*, 21, 2662-2669, 2002; *Expert Opin. Ther. Targets*, 9, 63-76, 2005 他)は、その後、欧米から類似研究が複数報告

されるなど、多大な注目を集めてきた。この過程で、血管透過性亢進を利用したパッシブターゲティングでは薬剤の細胞内導入効率が悪く、アクティブターゲティングの重要性を再認識させるデータが蓄積されてきた (*Biochim. Biophys. Acta*, 1669, 69-74, 2005 他)。これらの経験と知識を活用し、逆標的化 (Reverse-targeting, RT)、すなわちリポソームを抗原で修飾することにより、抗体産生細胞や免疫細胞に認識させるという新発想に至り、アレルギー性疾患、自己免疫疾患の治療用DDSのコンセプトをうち立てた。

(2) 本研究に近い研究として、これまでに OVA-コンジュゲートリポソーム処理による特異的 IgE 産生の抑制が報告されている (*Allergy Immunol.*, 121, 108-115, 2000)。しかしながら積極的に抗体産生細胞を抑制する研究ではない。我々と同様なコンセプトのものとして OVA とジフテリアトキシン (DT) の融合タンパク質を用いた研究がなされている (*Clin. Exp. Allergy*, 34, 1642-1648, 2004)。しかしながらこの研究成果を種々の疾患やアレルゲンに適用するのは容易ではない。本研究では、種々のアレルゲンや自己免疫疾患の原因抗原に、直接的に応用可能となる RT ナノキャリアの調製を目指しており、研究開始当初から、現在に至るまで、極めて独創的な研究と位置付けられる。

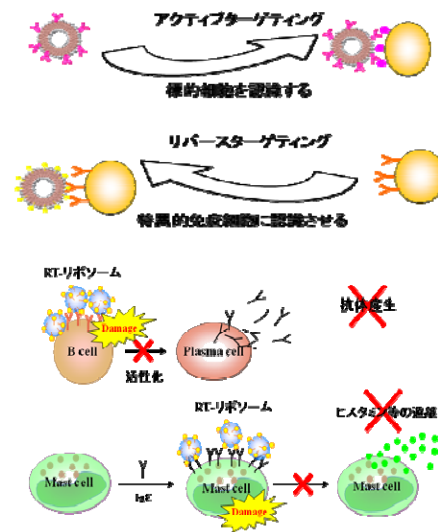
## 2. 研究の目的

本研究は薬剤キャリアを目的組織・細胞に到達させる標的化DDSの逆バージョンとして、目的の細胞に薬剤キャリアを認識させるインテリジェントな逆標的化DDS (Reverse Targeting DDS, RT-DDS) の新コンセプトにより、免疫疾患治療への応用の可能性を探ることを目的とする。

具体的には我々の有するリポソーム工学やDDS技術のノウハウを生かし、DDSの新発想により免疫疾患に対する画期的新薬開発の礎を築くものである。すなわち、抗原抗体反応を逆手にとって、抗原修飾 DDS 製剤により、抗体発現細胞や抗体結合細胞に逆標的化させるという新発想により、抗原特異的な免疫細胞のみを特異的に傷害し、アレルギーや自己免疫疾患の根本的な治療を目指すものである (図1参照)。元来、自己の生体分子に対する抗体産生細胞は、発生の段階でアポトーシスにより淘汰されている。アレルギー疾患などの生後になってか

ら問題となる抗体産生細胞、抗体結合細胞にアポトーシスを誘発する抗原修飾 DDS 製剤は、免疫疾患の根本的治療を可能とする

## 逆標的DDS の概念



と考えられる。

図1：本研究のコンセプトである逆標的化

## 3. 研究の方法

(1) RT-DDS の概念の証明 (Proof of Concept) については、OVAをモデル抗原とし、抗がん剤DOXをモデル薬物とした検討から、ほぼ達成された。すなわち、OVAで修飾したリポソームにDOXを内封し、OVA感作マウスに投与したところ、OVA特異的抗体の産生が抑制された。実際にRT-リポソームが免疫細胞を傷害しているかどうかの検討をおこなうため、本条件下で脾臓内の細胞のアポトーシスをTUNEL法で可視化することとした。一方で、これまで、OVAを結合していないリポソームが脾臓において胚中心様構造を形成し、そこに集積することを見出している。さらにOVA-結合DOX内封リポソームではABC現象がみられないことを予試験的に確認した。そこで、組織免疫学的検討と、実際のリポソーム体内動態の測定により、ABC現象の解明とOVA修飾リポソームの胚中心への集積についても検討を行った。

(2) 実際のRT-DDSの応用に当たっては、抗がん剤は用いることができないと考えられることから、市販の免疫抑制剤を用いた検討を行った。具体的には免疫抑制剤FK506を用いて、RT-DDSによる免疫抑制の可能性について検討した。これまでにOVA

感作モデルマウスの作製には成功している。OVAの感作では、アジュバントをFreund's 不完全アジュバントとするとIgG産生が、Alumを用いるとIgE産生が優位になるとされている。そこで、本検討ではAlumをアジュバントとして用いた。またOVA結合リポソーム(RTリポソーム)としては、ジパルミトイルホスファチジルコリン、コレステロールよりなる生体内で安定なものを用い、DSPE-PEG-NHSにOVAを結合しリポソームに修飾した。ところで、FK506に関して同様のリポソーム化を行ったところ、内封率が極めて劣ることが明らかとなった。そこでまず、種々の組成のリポソームを形成し、FK506の内封率を上げられるか否かから検討した。

### (3) 花粉症モデルの構築とRT-DDSの評価:

これまでに種々のアレルギー疾患モデル動物が作製されている。この中から適するものを選択し本研究の実用化を目指す。具体的にはアレルギー疾患のモデルとしてスギ花粉モデルを考えた。アレルギー性鼻炎(花粉症)の発症メカニズムは、スギ花粉が抗原となり鼻粘膜に吸入・接触あるいは目の粘膜に接触することにより体内の抗体(IgE)と粘膜上のマスト細胞が過剰に反応することでマスト細胞からヒスタミンなどが放出することによって不快症状を引き起こす。花粉症の抗原としてCry j-1、-2が知られており(Sone, et. al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 619, 1994; Namba, et. al. *FEBS Lett.* 353, 124, 1994他)、特異的IgE抗体価の上昇やT細胞の活性化が報告されている(Hashimoto, et. al. *Clin. Exp. Allergy* 25, 848, 1995; Sugimura, et. al. *Allergy* 51, 732, 1996他)。これらの抗原タンパク質をPBSに溶解し鼻腔内に2週間隔で2回投与することで感作させる。花粉症モデルマウスの評価系としては、キャプチャー法によるIgE抗体価の確認、Evan's blue投与後の鼻腔粘膜からの色素の漏出によって評価することが可能となる。

そこでまず抗原たんぱく質の花粉からのCry j-1抽出条件の検討を行った。種々の条件等の結果、限外濾過により、実験に耐える精製度の花粉抗原が得られた。

(4) ABC現象の解明と克服: 以前よりPEG修飾リポソームを動物に投与すると、2回目の投与時に長期血中滞留性が失われるABC現象が報告されている。申請者らはOVA未修

飾リポソームが、脾臓に胚中心様の構造を形成し共局在する可能性を見出している。ABC現象は脾臓摘出動物では見られないことが報告されており、我々の結果と一致する。さらにこれまでに、DOX-OVAリポソームの投与により、ABC現象が消失する可能性を予試験的に確認した。そこで、サイズや組成の異なるリポソームやナノ粒子の、胚中心様構造への集積を詳細に検討し、ABC現象の有無との関連について解析する。これによりABC現象の機構解明と回避法が明らかとなると考えている。細胞膜と同様の組成であるリポソームにより、ABC現象に見られる免疫反応を誘起すること、PEG修飾していないリポソームでもABC現象を誘起できることを考えると、ナノ粒子という性質による可能性がある。このような大胆な仮説を立てて、リポソーム以外のナノ粒子についても詳細に検討した。具体的には100 nm以上のナノ粒子はリポソームのエクストルージョン法により調製し、10 nmから100 nmまでのナノ粒子はポリエチレングリコールを外に向けた高分子ミセルを用いた。

## 4. 研究成果

### (1) RT-DDS の概念の証明:

抗原認識細胞に選択的に薬剤を送達することができれば、抗原特異的に免疫反応をコントロールできる可能性があり、有用な免疫疾患治療法として期待できる。これまでにモデル抗原としてOVAをリポソーム膜表面に修飾した、OVA修飾リポソームを用いてRT-DDSの有用性を検証してきた。OVA-1リポソームは脈内投与後、OVA感作マウス脾臓において、抗原刺激により活性化されたB細胞の分化、成熟の場として知られる胚中心に局在することを明らかにした。

本研究では、さらにOVA-ADMの作用機構をより詳細に検討した。OVA感作マウスにOVA-ADMを尾静脈内投与し、脾臓における作用を検討した。その結果、OVA-ADMは胚中心でアポトーシスを誘導することが明らかとなった。続いて、対照抗原としてヒト血清アルブミン(HSA)を用い、OVA-ADMによる抗体産生抑制作用の抗原特異性を検討した。その結果、OVA-ADMはHSA修飾ADM内封リポソームに比較し、OVA特異的IgEの産生を有意に抑制することが明らかとなった。

以上の結果から、抗原修飾リポソームは特異的に免疫細胞に認識されて内封薬剤が作用すると考えられ、RT-DDSの抗原選択的な薬剤送達技術としての可能性が示された。

## (2) FK506 を用いた RT-DDS:

RT-DDS の免疫疾患治療への応用をめざし、リポソームに内封する薬物として免疫抑制剤である FK-506 (タクロリムス) を用いた検討を行った。まず、OVA 修飾 FK506 内封リポソーム (OVA-FK) を調製した。調製したリポソームは製剤学的に安定であり、血清存在下でもリポソームの凝集や内封薬物の漏出は見られなかった。次に、OVA 感作マウスに OVA-FK を尾静脈内投与し、体内動態を検討した。その結果、OVA-FK は脾臓に多く集積することが明らかとなった。さらに、脾臓内におけるリポソームの局在を検討した結果、OVA-FK は B 細胞および脾中心に局在することが明らかとなった。OVA-FK の薬理作用を、抗体産生量を指標に評価した。OVA 感作マウスに OVA-FK を尾静脈内投与後、追加免疫を行い、血清中の OVA 特異的 IgG および IgE 抗体量を ELISA 法により測定した。その結果、OVA-FK 投与群において OVA 特異的 IgG の産生が有意に抑制され、OVA 特異的 IgE の産生も抑制されることが明らかとなった。

## (3) RT-DDS の花粉症への応用:

花粉症は日本人の約5人に1人が罹患しているスギ花粉抗原を代表とする季節性アレルギー疾患であり、日々の症状の辛さによる QOL 低下から根本的な治療法の早期開発が強く望まれている。本検討では、花粉抗原を修飾させた薬剤内封リポソームを、花粉抗原特異的な免疫担当細胞に逆標的化させ、内封する薬剤により選択的に傷害することで根本的な治療を行うことを目的とした。この戦略を検討するために、本研究ではスギ花粉症モデルマウスを用いて、スギ花粉抗原である Cry j 1 を修飾した薬剤内封リポソームの有用性を検討した。

まず、スギ花粉から Cry j 1 の抽出を行った。本検討では、精製スギ花粉粉末を PBS 中で攪拌することにより溶出し、限外ろ過法により精製を行った。最終的に得られた Cry j 1 を ELISA 法により定量を行ったところ、高い精製度を持つ Cry j 1 溶液を得ることができた。次に、得られた Cry j 1 溶液を用い、花粉症モデルマウスの作製を試みた。BALB/c 雌性マウスに 1 次免疫として Cry j 1 溶液を腹腔内投与し、その後 2 次免疫として同溶液を経鼻投与した。マウスから眼底採血し、血液中の抗 Cry j 1-IgE 抗体および IgG1 抗体量を ELISA 法により測定して抗体産生の推移を確認した結果、共に産生を確認することができた。

そこで次に、Cry j 1 修飾リポソームの作製を行った。DPPC と Cholesterol から成るリポ

ソームを調製し、次に DSPE-PEG-NHS 脂質誘導体を、調製したリポソームと混和することで NHS をリポソーム表面に修飾した。さらに、Cry j 1 溶液を加えて反応させることにより Cry j 1 のリポソーム表面への付加を行った。調製したリポソームについて HPLC を用いて Cry j 1 の定量を行ったところ、Cry j 1 の修飾が確認できた。修飾された Cry j 1 の抗原活性を確かめるため、Biacore<sup>®</sup>、DiI 標識リポソームを用いて検討したところ、抗 Cry j 1-IgG1 抗体との特異的な反応が見られ、リポソームに修飾された Cry j 1 の抗原活性が保たれていることが確認された。

Cry j 1 修飾 ADM 内封リポソームを用いて、花粉症モデルマウスに対する治療実験を行った。その結果 Cry j 1 修飾 ADM 内封リポソームを投与した群で、抗体の産生抑制効果が見られた。

## (4) ABC 現象の解明と克服:

ABC 現象の解明のため、サイズの異なるナノ粒子による ABC 現象の発現を検討した。その結果、50nm 以上のサイズのナノ粒子で ABC 現象は誘発されるが、小さいナノ粒子では誘発されないことを明らかにした。またリポソームに DOX を内封すると、特異的な免疫細胞を傷害するために ABC 現象が誘発されないことを明らかにした。

以上、逆標的化のコンセプトが今後のアレルギー、免疫疾患の根本治療に有効である可能性を強く示唆することに成功した。

## 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 7 件)

- ① Hiroyuki Koide, Tomohiro Asai, Kentaro Hatanaka, Shuji Akai, Takayuki Ishii, Eriya Kenjo, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Hideo Tsukada, Naoto Oku (査読有): T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes. *Int. J. of Pharmaceutics* 392, 218-223 (2010)
- ② 小出裕之、浅井知浩、畑中剣太郎、清水広介、横山昌幸、石田竜弘、際田弘志、奥直人 (査読有): PEG化ナノキャリア頻回投与による accelerated blood clearance 現象の機構解明. *YAKUGAKU ZASSHI*, 129, 1445-1451 (2009)
- ③ Hiroyuki Koide, Tomohiro Asai, Kentaro Hatanaka, Takeo Urakami, Takayuki Ishii,

Eriya Kenjo, Masamichi Nishihara, Masayuki Yokoyama, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Naoto Oku(査読有): Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon.*Int. J. Pharm.*, 362, 197-200 (2008)

[学会発表] (計 10 件)

- ①横山智紀: RT-DDS を応用した新規スギ花粉治療法の開発. 第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2010 年 11 月 29 日. 富山
- ②Hiroyuki Koide: Elucidation of ABC phenomenon caused by repeat injection of PEGylated nanocarrier. 4th International Liposome Society Conference. 2009 年 12 月 14 日. London, UK.
- ③小出裕之: PEG 修飾ナノキャリアー頻回投与による ABC 現象の機構解明. 日本薬学会第 129 年会. 2009 年 3 月 26 日. 京都
- ④小出裕之: ナノキャリアー頻回投与時における ABC 現象の機構解明. 第 24 回日本 DDS 学会. 2008 年 6 月 30 日. 東京

[その他]

ホームページ等

[http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~radiobio/gyouseki\\_MBC.html](http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/~radiobio/gyouseki_MBC.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: 1 0 1 6 7 3 2 2

### (2) 研究分担者

浅井 知浩 (ASAI TOMOHIRO)  
静岡県立大学・薬学部・講師  
研究者番号: 0 0 3 8 1 7 3 1  
清水 広介 (SHIMIZU KOSUKE)  
静岡県立大学・薬学部・助教  
研究者番号: 3 0 4 2 3 8 4 1