

ポリエチレングリコール修飾リポソームの 2 回目投与時に見られる
動態変化に関する血液蛋白の研究

市原理子

はじめに

ポリエチレングリコール (polyethylene glycol: PEG) 修飾リポソーム (Stealth liposome: SL) は長期血中滞留性リポソームとして開発された。SL の高い血中滞留性は、リポソーム表面を覆う PEG 鎖自体の立体障害及びその表面における水和相の形成によるものであると考えられており、このような PEG の作用により、血清蛋白や肝マクロファージなど単核食細胞系 (mononuclear phagocyte system: MPS) に属する細胞との相互作用が抑制されていると理解されている。既に、北米及びヨーロッパにおいて、抗がん剤のドキシソルピシン封入体が Doxil あるいは Caelyx という商品名で市販されており、2007 年 2 月に日本においてもその使用が承認された。

リポソームを含む薬物キャリアとして重要なことは、いかなる投与条件においても、予測された血中濃度及び体内分布を維持することである。もし、その動態に変化が生じた場合、内封薬物の効果減弱及び予測不可能

な副作用の発現が生じる恐れが考えられる。しかし、昨今 SL をはじめとするナノサイズの薬物キャリアにおいて、その開発は先行して行われるものの、その体内動態といった基礎的研究はほとんど行われていないのが現状である。ナノサイズキャリアの臨床応用を可能とするためには、これらの生体内における安全性確保が重要であり、そのためにも臨床で通常行われる繰り返し投与時の動態を把握しておく必要がある。このような状況にあって、SL をモデルとして用い、ラットに SL を複数回投与し、その動態を検討した。その結果、投与間隔 3~7 日において、2 回目投与 SL は従来の高い血中滞留性を示さず、投与間隔に応じて血中から速やかに消失し、主に肝臓に取り込まれることが明らかとなった (図 1 A, B)。このような現象を、“accelerated blood clearance (ABC) 現象”と名づけ、検討を開始した。本検討の開始時において、以下の知見が得られていた。

2 回目投与 SL は主に肝マクロファージに取り込まれる、肝マクロファージによる SL の肝取り込み亢進は細胞数の増加によるものではなく、取り込み能の

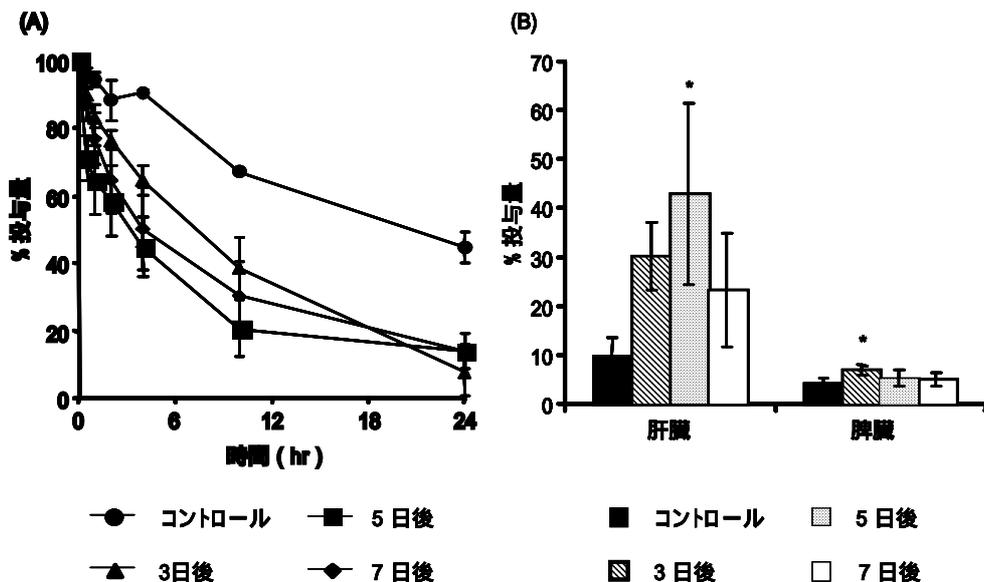


図 1 Accelerated blood clearance 現象 (ABC 現象)

亢進によるものである、1 回目投与後血中に分泌される因子が ABC 現象の発現に関与する。本研究において、これらの得られた知見に基づき、ABC 現象の発現の要因として生体側の因子の関与を考え、この点について検討を行った。

血清因子の関与

血清中には、異物表面に特異的に結合することにより MPS による異物認識及び貪食を亢進させるオプソニン因子と呼ばれる因子が存在する。このオプソニン因子がリポソーム表面に結合することにより、その動態に影響を与えることが知られている。この点を考慮すると、1 回目投与後血中に分泌される因子が 2 回目投与 SL 表面に結合することにより、この SL の肝取り込みを亢進させる、つまりオプソニン因子として機能すると推測した。この仮説にしたがい、血清因子の関与の可能性について以下の検討を行った。

無処置ラット血清あるいは ABC 現象の発現時 (SL 1 回目投与 後5日目) に採取した血清と SL をインキュベーション (37 °C、15 分) した後、ゲルろ過 (Sepharose 4 fast flow) によりリポソーム画分のみを採取した。この画分中のリン脂質量及び蛋白量を定量し、単位脂質当たりの結合蛋白量 (protein binding value: P_b 値) を算出し、SL 表面の結合蛋白量を評価した。 P_b 値は、SL 投与後 2 日目からコントロールである無処置との間に有意な差が見られ、5 日目まで徐々に増加していき、6 日目以降徐々に減少していき、14 日目ま

でコントロール値まで戻るパターンを示すことがわかった。この P_b 値の変動を、ABC 現象の発現時に見られる SL 肝取り込み亢進の指標である肝クリアランス (hepatic clearance: CLh) の経日変化と比較した。CLh は SL 1 回目投与後 4 日目から急激な増加を示し、8 日目までにはほぼコントロール値まで戻る変動パターンを示し、 P_b 値とは異なる変動を示すことがわかった。したがって、SL 表面の結合蛋白量の増加は、ABC 現象の発現の程度に直接関係しないことが示された。このことから、SL 表面の結合蛋白のうち、特異的に結合する蛋白が ABC 現象の発現に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

SL 表面結合蛋白の同定

次に、SL 表面の結合蛋白に関して、SDS-PAGE 及び 2 次元電気泳動 (2-DE) を行い、特異的結合蛋白の有無を検討した。その結果、無処置ラット血清 (コントロール) を用いた場合と比較して、SL 1 回目投与後 5 日目 (ABC 現象の発現条件下) に採取した血清を用いた場合、SDS-PAGE 及び 2-DE においても、それぞれ特異的なバンドあるいはスポットが観察された。しかし、血清蛋白は比較的分子量が大きいものが多く、両検討とも還元条件下で行っているため、特異的バンド及びスポットに相当する蛋白の分子量や種類を推定することはできなかった。しかし、2-DE から得られた特異的スポットから、IgM (μ)、IgG、apo A- α 、apo-E などが候補として考えられた。

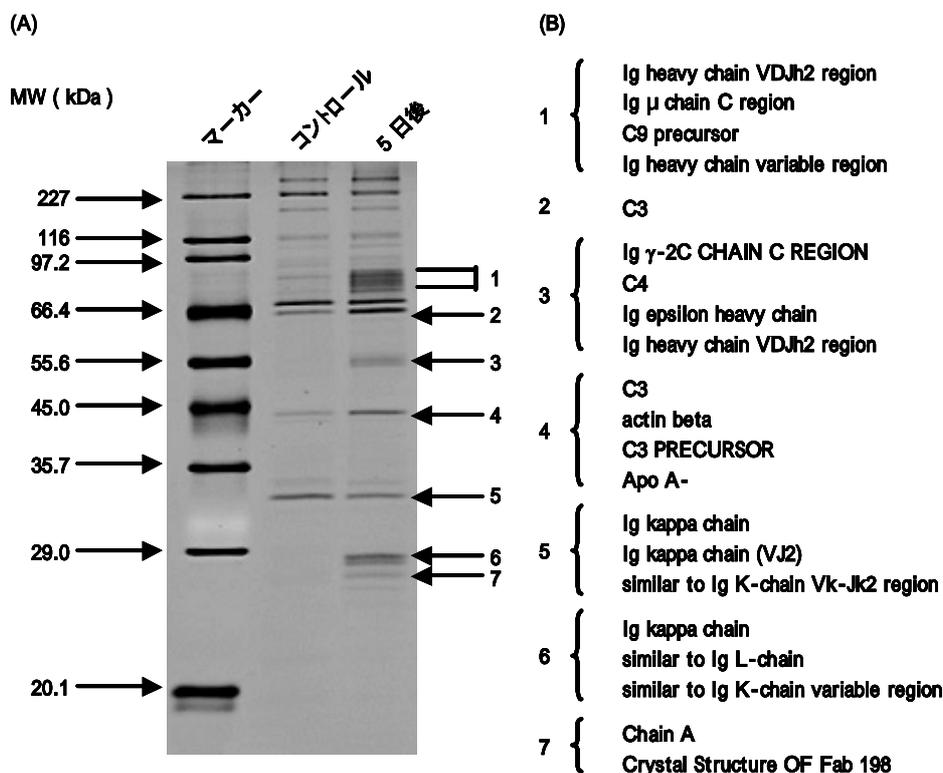


図 2 SL 表面結合蛋白に関する LC-MS/MS 解析

さらに、SDS-PAGE の検討において示された特異的バンド (図 2A、矢印 1~7) に関して、LC-MS/MS を用いた解析を行った、これらの特異的バンドに相当する蛋白のほとんどが、イムグロブリンのフラグメント及び補体系に属するものであることがわかった (図 2B)。

イムグロブリンのうち、IgG 及び IgM の 2 種のサブクラスがリボソームの肝取り込みに関与していることが知られている。したがって、IgG 及び IgM のどちらのクラスが関与しているのかを明らかにするため、ウェスタンブロットングにより、SL 表面における IgG 及び IgM の検出を行った。その結果、SL に特異的に結合している蛋白は主に IgM であり、IgG はほとんど結合していないことが明らかとなった。IgM は強力な補体系活性化因子として知られている。そこで、補体系因子のうちオプソニン作用のある C3 についても検討したところ、C3 も同様に SL 表面に結合していることがわかった。さらに、ABC 現象の発現条件下において、C3 は活性型の iC3b に変換された状態で SL 表面に多量に結合していることがわかった。

脾臓の役割

脾臓は血流中の抗原に対する免疫反応において重要な役割を果たし、また IgM の主たる分泌臓器である。この点を考慮し、脾臓摘出ラットを用い、脾臓の ABC 現象の発現への関与について検討を行った。SL 1 回目投与前に脾臓を摘出することにより、ABC 現象の発現が著しく抑制されること、さらに SL 表面に結合する IgM 量も顕著に減少することが示された。これらの結果から、2 回目投与 SL 表面に特異的に結合している IgM は脾臓から分泌される可能性が高いと考えられた。このことは、脾臓が ABC 現象の発現において重要な役割を果たしていると言える。また、脾臓が IgM 産生

に関与するのは、SL 1 回目投与後 1 日目から 3 日目頃までであることもわかった。

さいごに

本研究により、ABC 現象発現メカニズムに関して、以下のように類推した (図 3)。つまり、1 回目投与 SL に呼応して脾臓より血中に IgM が分泌される。この IgM が 2 回目投与 SL 表面の PEG に結合することにより、補体系の活性化が誘導され、引き続いて補体系因子である C3 が 活性型 iC3b に変換される。この iC3b が 2 回目投与 SL の肝マクロファージによる取り込みを亢進させていると推測した。

近年、ABC 現象の発現は、SL 以外のナノサイズキャリアにおいても報告されている。このことは、キャリア開発時においてキャリアと生体、特に免疫系との相互作用に関する基礎的研究の必要性を強く示唆するものと言える。ここで得られた知見が、SL を始めとするナノサイズキャリアの開発・臨床応用に役立つことを期待する。

謝辞 本研究の遂行及び本論文の作成にあたり、御指導・御鞭撻を賜りました徳島大学薬学部の際田弘志教授及び石田竜弘准教授に心より感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、御高配・御協力を賜りました大阪市立環境科学研究所食品保健担当の皆様にご感謝いたします。

(本文は、著者が徳島大学において平成 19 年 9 月 13 日に博士 (臨床薬学) の学位を授与された際の論文の概要であり、その詳細は、「J. Control. Release, 112 (1), 15-25, 2006」及び「J. Control. Release, 115 (3), 243-250, 2006」に掲載されている。)

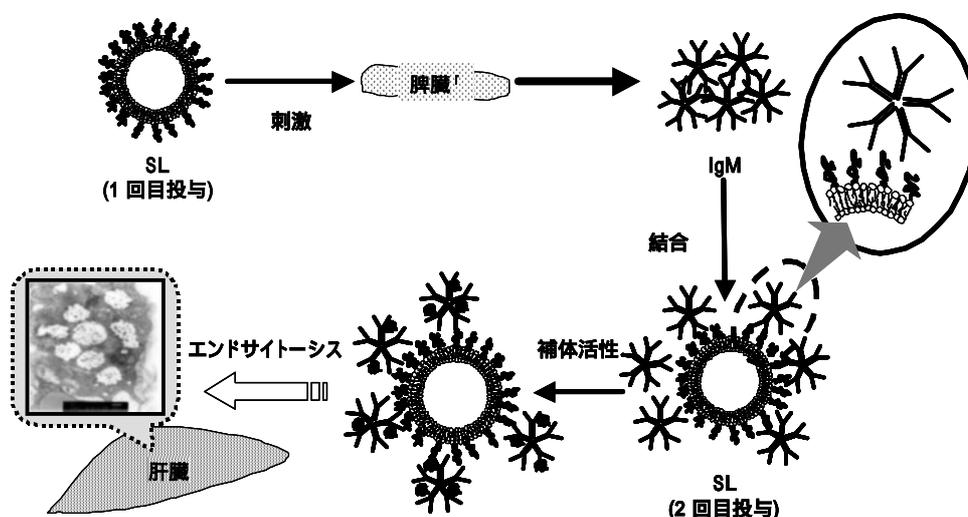


図 3 ABC 現象発現メカニズムにおける仮説