

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

標的指向型DDS製剤を用いた腎疾患治療方法の開発

所 属 国立国際医療センター研究所 臨床薬理研究部

研究者 名取 泰博

分担研究者

テルモ株式会社研究開発センター 木村 順治

要旨

本研究では糸球体に指向性を有する DDS 製剤・塩基性脂質 TRX-20 添加ポリエチレングリコール修飾リポソームを開発し、これにステロイド剤を内封させた薬剤がメサングウム増殖性腎炎及び半月体性腎炎の動物モデルにおいて有効であることを示した。

1. 研究目的

現在、慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症の進行を確実に阻止する方法はなく、その多くは慢性腎不全へと移行し、人工透析や腎移植を必要とするようになる。維持透析の普及は慢性腎不全患者の生命を救うという点では画期的な方法ではあるが、患者の平均余命は依然として正常人より10年以上短いと言われており、また患者の QOL の点からも慢性腎不全を阻止することが重要な課題であることには変わりはない。ステロイド剤は種々の腎炎の治療に広く用いられているが、その副作用が大きいこともあり、その使用には種々の制限がある。

木村らは新規に開発した塩基性脂質 TRX-20 (3, 5-dipentadecyloxybenzamidinium hydrochloride) を添加したポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームが培養腎糸球体メサングウム細胞に選択的に取り込まれることを見いだした。そこで本研究では、糸球体に指向性を有する新しい DDS 製剤の開発を目指し、同リポソームにプレドニソロンを内封させたりポソーム製剤を用いて、副作用の少ない新しい治療法を開発することを目的とする。

2. 研究方法

カチオン化脂質 TRX や PEG 誘導体の割合を総脂質量に対して変化させた PEG 修飾リポソーム (TRX リポソーム) を調製し、血中安定性に関与するタンパク質との相互作用や、様々な細胞、特に血管内皮細胞とそれ以外の細胞との相互作用を比較して検討した。

腎炎モデルとしては抗 Thy-1 モノクローナル抗体 (OX-7) をラット尾静脈よりに投与して作製するメサングウム増殖性腎炎モデル及び Wistar Kyoto 系ラット (雄、90-110 g 体重) にウサギ抗ラット糸球体基底膜抗血清 (20 μ L/100 g 体重) を尾静脈投与して作製する半月体性糸球体腎炎モデルを用い、これにリン酸プレドニゾロンナトリウムを内封させたりポソーム製剤を投与してその効果を調べた。

またラットにおけるリポソームの挙動は、ローダミン標識ステロイド内封リポソームを用いて行った。すなわち、上記と同様の腎炎モデルを惹起後、標識リポソームを投与し、24時間後に屠殺して腎を採取した。PAS 染色を行い、同一切片上にて光顕所見及びローダミンの蛍光所見を調べた。

3. 研究成果

血清成分や培養細胞との相互作用を調べた結果、TRX が 30 mol% 以上では PEG で表面を修飾していても血液中の蛋白質との相互作用によりリポソームは凝集してしまうが、それより少ないと PEG によって凝集を防げることがわかった。また、TRX を 8 mol% まで減らすと血管平滑筋細胞や、腎糸球体のメサングウム細胞、またある種の腫瘍細胞には取り込まれるが、血管の内皮細胞とは相互作用しないことがわかった。なぜ細胞種によってカチオン性リポソームとの相互作用の度合いが異なるのかは非常に興味深い。カチオン化脂質と DNA の複合体の場合、細胞への相互作用に、細胞表面の成分の一つであるグリコサミノグリカン (GAG) との相互作用が関係していることが知られている。そこで細胞表面の GAG に着目し、どの糖鎖が相互作用に関与するのかを調べたところ、平滑筋細胞や、メサングウム細胞と 8 mol% の TRX リポソームの相互作用にはコンドロイチン硫酸が関与することがわ

かった。またこのリポソームと GAG との相互作用は TRX の割合を変えることで微調整でき、内皮細胞の表面の支配的な GAG であるヘパラン硫酸へは結合しないがコンドロイチン硫酸には結合できるリポソームが得られることがわかった。これらの結果からカチオニックリポソームと生体成分との相互作用はカチオン化脂質の種類だけではなく、密度にも依存することが示された。

次に、メサンギウム細胞に対して結合活性を示す表面修飾リポソームにリン酸プレドニゾロンナトリウムを内封させた製剤を作成し、抗 Thy-1 抗体 (OX-7) を静注して作成したラット腎炎モデルを用いて、糸球体腎炎への応用を検討した。まず、ローダミンで標識した径約 100nm の表面修飾リポソームを調製し、腎炎ラットと正常ラットにそれぞれ静脈内投与して、経時的に組織集積量を測定して、同リポソームの腎臓に対する集積性を検討した。抗 Thy1 抗体投与モデルでは、投与翌日から 8 日目にかけて、糸球体のメサンギウム細胞が増殖し、糸球体腎炎が進行するが、蛍光標識リポソームは、このように進行した腎炎ラットの腎臓 (特に腎・皮質) においては投与後 72 時間以上に渡り、リポソームの集積が認められたが、正常なラットの腎臓にはほとんどリポソームは集積しなかった。また、その局在は腎糸球体内に限局していることが蛍光顕微鏡観察により確認された。これは炎症が起こることで糸球体の内皮細胞の間隙がルーズになったため、血中に滞留しているリポソームが糸球体に侵入しやすくなったと考えられた。

次いで同リン酸プレドニゾロンナトリウム内封リポソーム製剤の腎炎に対する治療効果を検討した。抗 Thy-1 抗体で腎炎惹起後 4 日目に同リポソームを静脈内投与し、さらにその 4 日後に剖検して、腎臓の組織標本を作製して観察した。この際、リポソームの対照薬として内封薬物であるリン酸プレドニゾロンナトリウムの生食溶液を 4 日目から連日投与した。リポソーム化されたリン酸プレドニゾロンナトリウムは、0.1mg/kg 以上の用量を 1 回投与するだけで有意な細胞増殖抑制を示したのに対して、リン酸プレドニゾロンナトリウムの生食溶液群では、有意な作用を示すためには、1mg/kg/day 以上の用量を連続投与することが必要であった。すなわち、表面修飾リポソームにリン酸プレドニゾロンナトリウムを封入する事により、1/10 以下の量で有効性を示すことが明らかになった。また、特にリポソーム投与群では活性化されたメサンギウム細胞 (α -smooth muscle actin 陽性細胞) の有意な増加抑制が認められ、リポソーム化されたリン酸プレドニゾロンナトリウムがメサンギウム細胞の活性化および増殖を抑制することが示された。これらの結果は、表面修飾リポソームが糸球体への集積とメサンギウム細胞へのターゲティングにより内封薬物であるリン酸プレドニゾロンナトリウムの効果を增强していることが示唆された。

次に他の型の腎炎への効果を調べるために、半月体性糸球体腎炎モデルに対する同製剤について調べた。半月体性糸球体腎炎は管外増殖性糸球体腎炎とも呼ばれるように、糸球体毛細血管外 (ポーマン腔内) への炎症細胞の集積と上皮細胞の増殖が見られる腎炎である。同モデルでは腎炎惹起後 7 日目までに尿蛋白の上昇が見られ、組織学的には単球やリンパ球の糸球体への浸潤も顕著であり、多くの糸球体に細胞性半月体が形成される。その後、蛋白尿は維持され、次第に腎機能の低下が起きて血清クレアチニン値や BUN が上昇し、60~100 日目には腎不全に陥り死亡する。このモデルに対しては、腎炎惹起後 7 日目から 1 週間に 1 回、21 日目まで計 3 回薬剤を投与し、28 日目に屠殺した。また用量はリポソーム化リン酸プレドニゾロンナトリウム及び同薬剤の生食溶液をそれぞれ 1 mg/kg/回と 3 mg/kg/回の 2 群ずつ行った。

リポソーム化リン酸プレドニゾロンナトリウムを投与した群はどちらも治療を開始した 7 日目から尿蛋白の増加が抑えられたのに比べ、未治療群やリン酸プレドニゾロンナトリウム生食溶液投与群では 28 日目まで尿蛋白量が増加した。その結果、未治療群と比較してリポソーム投与群では 21 日目と 28 日目に尿蛋白量が有意に低かった (21 日目、 254 ± 85 vs. 143 ± 74 mg/day, $p < 0.05$; 28 日目、 335 ± 129 vs. 133 ± 82 mg/day, $p < 0.01$)。28 日目の BUN は未治療群に比べてリポソーム 1 mg 群で有意に低かったが (22 ± 7 vs. 15 ± 2 mg/dL, $p < 0.01$)、リポソーム 3 mg 群及び生食溶液 3 mg 群はやや低い値を示したものの、個体差が大きく有意差は得られなかった。また血清クレアチニン値はリポソーム 3 mg 群で低い傾向が見られたが、やはり個体差のために有意ではなかった。

28 日目の未治療群では糸球体の $59 \pm 30\%$ に半月体形成が見られたのに対し、生食溶液 3 mg 群及びリポソームの両群では半月体形成率が有意に低かった (生食溶液 3 mg 群、 $11 \pm 3\%$, $p < 0.0001$; リポソーム 1 mg 群、 $8 \pm 3\%$, $p < 0.0001$; リポソーム 3 mg 群、 $3 \pm 2\%$, $p < 0.0001$)。この結果は尿蛋白値や BUN などの臨床的所見と良く一致すると考えられた。

ステロイド剤の抗炎症効果を見るために、糸球体内の白血球数を免疫組織学的に測定した。その結果、糸球体内の単球/マクロファージ数は未治療群に比べて、リポソーム群はいずれも少なかった (未

治療群、 25 ± 3 ；リポソーム 1 mg 群、 20 ± 3 , $p < 0.01$ ；リポソーム 3 mg 群、 17 ± 1 , $p < 0.0001$ ）。一方リン酸プレドニゾロンナトリウム生食溶液群はいずれも未治療群と比較して有意差はなかった（1 mg 群、 25 ± 3 ；3 mg 群、 23 ± 1 ）。糸球体内 CD4 陽性細胞数は生食溶液群、リポソーム群ともに未治療群に比べて有意に少なく、またリポソーム 3 mg 群では他の治療群に比べて有意に少なかった（未治療群、 2.9 ± 0.6 ；生食溶液 1 mg 群、 1.8 ± 0.1 , $p < 0.0001$ ；生食溶液 3 mg 群、 1.7 ± 0.4 , $p < 0.0001$ ；リポソーム 1 mg 群、 1.8 ± 0.3 , $p < 0.0001$ ；リポソーム 3 mg 群、 1.2 ± 0.2 , $p < 0.0001$ vs 未治療群, $p < 0.05$ vs 他治療群）。また CD8 陽性細胞数についても生食溶液 1 mg 群を除き、他の治療群で有意に減少していた（未治療群、 4.4 ± 0.5 ；生食溶液 1 mg 群、 4.1 ± 0.2 , $p > 0.05$ ；生食溶液 3 mg 群、 3.6 ± 0.6 , $p < 0.01$ ；リポソーム 1 mg 群、 3.2 ± 0.3 , $p < 0.0001$ ；リポソーム 3 mg 群、 2.7 ± 0.3 , $p < 0.0001$ ）。また生食溶液 3 mg 群に比べてリポソーム 3 mg 群は有意に少なかった（ $p < 0.001$ ）。尚、空のリポソーム投与群は未治療群と比べていずれの数値においても差はなく、上記の治療効果はリポソームに内封したステロイド剤によることが示された。

最後に半月体性糸球体腎炎モデルにおいても、ステロイド内封リポソームが糸球体に集積しているか否かをローダミン標識したリポソームを用いて検討した。その結果、ローダミンの蛍光が糸球体に集積している像が観察されたことから、同モデルにおいても本リポソーム製剤は糸球体指向性を示すことが確認された。

以上の結果から、メサンギウム増殖性糸球体腎炎、半月体性糸球体腎炎のいずれのモデルにおいても、ステロイド内封リポソームは疾患糸球体に集積する性質を示し、そのために、フリーのステロイド剤に比べて臨床的及び病理的な治療効果が高いことが明らかとなった。

4. 考 察

ステロイド剤は抗炎症作用、免疫抑制作用が強い反面、易感染性などの副作用も強いためにその多用には問題が多い。本研究は糸球体に指向性を有するリポソームにステロイド剤を内封させることにより、副作用を抑えて効果的に糸球体障害を抑制することを試みた。その結果、同製剤が *in vitro* で親和性を示したメサンギウム細胞が増殖する型の糸球体腎炎ばかりでなく、糸球体毛細血管壁の障害に起因し上皮細胞の増殖と白血球浸潤が顕著な半月体性糸球体腎炎においても、同製剤が糸球体指向性を示し、両モデルにおいてフリーのステロイド剤に比べて有意に良好な治療効果を示すことが明らかとなった。

近年、生体内で安定なりポソームを製造する技術が開発されたことにより、リポソームの実用化への道が開かれた。特に、この課程で開発された PEG 修飾リポソームは、その長期循環型の性質と、適当な粒径により、結果的に標的組織にかなりの量が集積する、パッシブターゲットング製剤となった。このような標的組織集積性は、必要な場所に、必要な時間、必要な量だけ、薬物を作用させるという DDS の理想に明らかに一步近づいた成果である。

しかし、ターゲットング DDS に期待される機能の点から見るとこの成果はまだ初歩的なものである。副作用低減の面でいえば、肝臓や腎臓などの主要代謝組織での毒性の軽減ができればその応用の範囲は大きく広がると考えられるが、そのためには薬物の投与量を大幅に減らす技術が求められる。標的組織での薬物の実効的な濃度を相対的に他臓器に比して上げることができれば、現在、副作用で使えない薬の復活も可能であろう。また、遺伝子を標的組織へ送達し、さらに標的細胞内へ直接導入することができれば、遺伝子治療にも貢献するであろう。これらの用途を満たすためには、安定な体内循環と標的細胞への選択的な相互作用のふたつの機能を両立させたりポソームが求められる。

このようなりポソームを現実化するためには何が必要であろうか。抗体や、ある種のリセプター結合蛋白などを組み込むのも一つの方法だが、安定性や、注射剤として実用的なレベルの品質を保つという観点で見ると、生体高分子の直接的な利用には困難が伴う。我々は、カチオン化脂質と PEG の組み合わせで、GAG との結合性に選択性を持たせられること、またそれにより選択的な組織集積性が付与できることを見いだしたが、実はこのような GAG との結合による組織集積は血液中を循環している低比重リポタンパク LDL が動脈硬化病巣へ蓄積するときにも関わっていることが報告されている。生体の選択性のメカニズムをうまく利用した安定なりポソーム製剤を開発するためには、生体の持つ特異的な相互作用を生化学的に緻密に解析し、それらを物理化学的な要素に分解したうえで、製剤設計に反映させていく作業が有効に働くものと考えられる。

5. まとめ

2 種類の糸球体腎炎の動物モデルにおいて、リポソームに内封したステロイド剤がフリーのステロ

イド剤に比べて良い治療効果を示すことがわかった。今後、巣状糸球体硬化症など他の糸球体疾患の動物モデルを用いて本製剤の有用性を検討することにより、本製剤の有用性を明らかにするとともに、その機序についてもさらに検討を進める予定である。

6. 研究発表

Ou ZL, Nakayama K, Natori Yu, Doi N, Saito T, Natori Y: Effective methylprednisolone dose in experimental crescentic glomerulonephritis. *Am. J. Kidney Dis.*, 37:411-417, 2001.

Harigai T, Kondo M, Isozaki M, Kasukawa H, Hagiwara H, Uchiyama H, Kimura J: Preferential binding of polyethylene glycol-coated liposomes containing a novel cationic lipid, TRX-20, to human subendothelial cells via chondroitin sulfate. *Pharmaceut. Res.* 18:1284-1290, 2001

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社