

## 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 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が糸球体に指向性を有し、これにステロイド剤を内封させた薬剤がメサンギ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ギ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リポソーム製剤を用いて、副作用の少ない新しい腎疾患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リポソーム (TRX リポソーム) にリン酸プレドニソロン (PSL) を内封したものを調製した。

カニクイザル(♂, 日本 E.D.M.)に、PSL あたりの脂質量をステロイドリポソームの約3倍強含む製剤 (3倍製剤) を調製し、PSL として 0.32mg/kg で静脈内投与した。投与は2週間間隔で行い1回目投与後:1, 3, 6, 24, 48, 96時間および1週間後、2, 3回目投与後:1, 24, 48時間後、4回目投与後:1, 6, 24, 48, 96時間、1週間および2週間後に採血を行い、血漿中 PSLP 濃度を測定した。

半月体性糸球体腎炎モデルは 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  $\mu$ L/100 g 体重) を尾静脈投与して作製した。陰性コントロール群には同量の正常ウサギ血清を投与した。ステロイド内封リポソーム (平均粒子径 129 nm、リン酸プレドニソロンナトリウム 0.6691 mg/mL、リン脂質 3.3 mg/mL)、空のリポソーム、及びリン酸プレドニソロンナトリウム粉末はテルモ株式会社より供給されたものを用いた。いずれの薬剤も生理食塩水により溶解あるいは希釈した。

実験プロトコールは以下の通りである。薬剤は腎炎惹起後 7 日目から 7 日毎に 35 日目まで尾静脈投与した。35 匹のラットを 7 群 (各群 n=5) に分け、1群:陰性コントロール、2群:疾患コントロール群として治療薬の代わりに同量の生理食塩水、3群:空のリポソーム、4群:リン酸プレドニソロンナトリウム (Free-PSL/1) 1 mg/kg 体重、5群:リン酸プレドニソロンナトリウム 3 mg/kg 体重 (Free-PSL/3)、6群:ステロイド内封リポソームをリン酸プレドニソロンナトリウムとして 1 mg/kg 体重 (Lipo-PSL/1)、7群:ステロイド内封リポソームをリン酸プレドニソロンナトリウムとして 3 mg/kg 体重 (Lipo-PSL/3)、をそれぞれ投与した。3群及び6, 7群に含まれるリポソームの量は同一になるように、空のリポソームを加えて調節した。1週毎に各ラットを代謝ケージに24時間入れて採尿した。また3週目から1週間毎に尾静脈より採血し、血清を分離して保存した。6週目にラットを屠殺し、血液及び腎を採取した。腎の一部はホルマリン固定、パラフィン包埋しPAS染色を行った。尿蛋白はビュレット法により、血清クレアチニン及び血液尿素窒素 (BUN) はそれぞれ市販キット (和光) を用いて行った。統計解析は StatView を用いて、ANOVA

法により行った。

### 3. 研究成果

最近オランダのグループは、リポソームを静脈内投与後、数日から数週間の期間においてリポソームを再投与すると、投与されたリポソームがまたたくまに血中からクリアーされる現象 (accelerated blood clearance phenomena: ABC 現象) を報告した。その原因は不明であるが、初回投与されたリポソームより一定期間の間に、何らかのタンパク (opsonic factor) が誘導され、そのタンパクの存在下でリポソームを投与すると、この蛋白がリポソーム表面に結合して、オプソニン作用を起こし、肝臓や脾臓の単核食細胞系への取り込みが加速されるものと報告されている。またこの現象は PEG により表面修飾されたリポソームにおいても起こることが報告されており、ステロイドリポソームにおいても起こる可能性が考えられた。そこで我々は、ラットにステロイドリポソーム (プレドニゾロンとして 0.32mg/kg) を反復投与したところ、ステロイドリポソームにおいても ABC 現象が起こることが確認された。さらにリポソームの脂質投与量を変えて実験を行ったところ、ラットにおいては ABC 現象によりクリアーされる脂質量には限界があり、脂質投与量が少ない時には体内動態が大きく影響を受けるが、脂質投与量が高くなるに従って見かけの影響が少なくなることが明らかになった。この結果より、ラットにおいては、ステロイドリポソームの薬効量である 0.32mg/kg での脂質投与量の 3 倍以上の脂質投与量であれば、実質的に ABC 現象の体内動態への影響が回避できるものと推定された。

PEG 化リポソームのヒトでの血中半減期は、ラットより長くなることが報告されており、臨床での投与間隔はラットに比べて長くなる可能性が考えられる。また ABC 現象は一定の期間を経ると消失することが報告されている。そこでヒトにおける TRM-484 の体内動態にこの ABC 現象がどのような影響を及ぼすかを見る目的で、PEG 化リポソームの血中半減期がヒトと同様に長いことが報告されているサルを用いて、反復投与時の血中動態を検討した。カニクイザルに、プレドニゾロンあたりの脂質量をステロイドリポソームの約 3 倍強含む製剤 (3 倍製剤) を調製し、それぞれプレドニゾロンとして 0.32mg/kg を 2 週間間隔で計 4 回静脈内投与し、それぞれの投与後の血中プレドニゾロン濃度を測定することによりリポソームの体内動態の指標とした。その結果、通常のリポソーム製剤及び 3 倍製剤とも、このスケジュールでは ABC 現象を認めなかった。以上の検討より、ABC 現象はヒトでの体内動態には大きな影響を及ぼさないことが予測されたが、動物を用いた薬効評価には大きな影響を持つことが明らかになため、ラットにおける薬効評価試験ではこの現象を回避するデザインで進める必要があると推定された。

ラットにおいては 1 mg/kg プレドニゾロン量であれば ABC 現象は回避できると推定されたものの、前述の半月体性糸球体腎炎モデルに対する治療実験ではリポソーム製剤を 1 週間毎に繰り返し投与しており、プレドニゾロン用量依存性はリポソーム製剤の ABC 現象の違いであるという可能性は否定できない。そこで同モデルについて、リポソーム総量としては同一で、かつ含有プレドニゾロン量を前回と同様、1 mg/kg/回と 3 mg/kg/回にして再度、同じプロトコールで治療実験を行った。またこの時は、経過を 6 週目まで観察した。その結果、同モデルに対するステロイドリポソームの治療効果にはステロイド量に対する用量依存性があることが明らかになった。さらに 6 週目までの観察により、腎機能に対する治療効果における有意差が明確になり、特に 3 mg/kg/回投与群においては、BUN の増加はほぼ完全に抑制された。

### 4. 考 察

近年、生体内で安定なリ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、パッシブターゲティング製剤となった。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歩近づいた成果である。

2000 年に見出された ABC 現象はこれまでに気づかれていなかった新しい現象であり、このようなリポソーム製剤に対する重要な注意喚起の報告であった。本研究から明らかになったように、ABC 現象はヒトの体内動態においては大きな問題ではないことが示唆されたが、ラットを用いた実験においては影響が出る可能性が高いため、実験計画を立てるにあたり、注意を要すると考えられた。

一方、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。そこで本研究で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目指して、ラット CreGN モデルを用いて、リポソーム製剤の有用性の検討を行っている。昨年度の本研究において我々はその有効性を示す結果を得たが、その用量依存的効果における ABC 現象の影響の有無が明らかでなかった。そこで今年度はこの点に注意を払

い投与リポソーム量を同一にして比較したところ、確かに Lipo-PSL が用量依存的にその治療効果を示すことが明らかになった。また今回は、治療効果として最も重要な腎機能への作用についても検討するため、腎炎惹起後 6 週目まで実験を行い、BUN 及び血清クレアチニン値を測定した。その結果、Lipo-PSL は本モデルにおける腎機能低下に対しても有意な治療効果を示すことが明らかとなり、特に 3 mg/kg/week 投与群では、BUN の上昇をほぼ完全に抑制することがわかった。また半月体形成に対しても Lipo-PSL は 1 週間に 1 回の投与でも有意に抑制することが確認され、以上の結果から、ステロイド内封リポソーム製剤は CreGN モデルに対して有効な治療薬であることが示された。

## 5. まとめ

DDS としてのリポソーム製剤の研究において、ラットを用いた動物実験を行う場合には ABC 現象を回避するような実験計画を立てる必要があることがわかった。これを踏まえて、進展が早くまた予後の悪い疾患半月体性糸球体腎炎の動物モデルにおいて、臨床的及び組織学的な指標を用いて調べた結果、リポソームに内封したステロイド剤は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。

## 6. 研究発表

Ou ZL, Deenitchina SS, Uwano M, Kato R, Natori Yu, Miyazawa S, Ushijima H, Kimura J, Natori Y: Treatment of Experimental Crescentic Glomerulonephritis with Liposome-Encapsulated Glucocorticoid. 投稿準備中

Morimoto K, Kawahara K, Ushijima H, Tomino Y, Kimura J: Targeting delivery of glucocorticoid by cationic liposomes selectively inhibits mesangial cell proliferation in experimental glomerulonephritis. 投稿準備中