

活性タンパク利用技術としての新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発研究

所属 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター
研究者 五十嵐理慧

分担研究者

- (1) 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター 武永美津子、水島裕
(2) 東京慈恵会医科大学総合医学研究所DDS研究所 木村道夫、水島裕

要旨

レシチン修飾活性ペプチド (PCSOD, PCBDNF) は著明な薬理効果の増強を示したが、その機序は細胞膜との強固な結合により MAPK (ERK1/2) 活性化が持続し細胞分化誘導が増強された結果である可能性が示唆された。修飾部位の特化可能な細胞外遺伝子操作による修飾生理活性ペプチド合成技術の確立をすすめている。生分解性高分子をキャリアーとした bFGF, CXCR4 拮抗薬、insulin の徐放製剤を作製評価した結果いずれも徐放化により薬理効果の増強が得られた。

1. 研究目的

「生理活性ペプチドを医薬品として臨床実用化する」ために新規ドラッグ・デリバリー・システム (DDS) 技術の確立を目的とする。生理活性ペプチドは生体内で必要なとき、必要な場所で、必要量分泌または生成されるため外からそのままの形で薬として投与してもすぐに代謝されたり、組織親和性が低いなど十分な効果が得られないことが多く臨床実用化のためには適切な DDS の導入が必須である。

具体的内容としては(1) 生理活性ペプチド (SOD, BDNF) のレシチン化と評価 (2)細胞外遺伝子操作による修飾生理活性ペプチド(レシチン化 BDNF)の合成 (3)成長因子の徐放機能を持つスキャホールドとして応用可能なグリコサミノグリカンおよび PLGA を用いたペプチドのマイクロカプセル化を目的とする。

(1) 我々独自の DDS 技術である生理活性ペプチド (タンパクを含む) のレシチン化については、これまでスーパーオキシドデイズムターゼ (SOD) やインターロイキン-6 にレシチン誘導体を結合すると細胞・組織親和性が増大することで顕著な薬理効果の増強が得られることを示してきた。この技術を脳神経由来神経栄養因子 (BDNF) に導入し、神経系への DDS を検討する。またレシチン化 SOD (PCSOD) およびレシチン化 BDNF (PCBDNF) を従来の評価系に加えて外傷性脊髄損傷モデルにおける運動機能低下の回復 (神経再生) 効果でも評価する。さらにペプチドのレシチン化による薬理効果増強の機序を解明する。

(2)生理活性ペプチドの化学修飾はこれまで有機合成法で作製されているが、ペプチドの修飾部分の特定が困難である上、ペプチド1分子あたりの修飾基導入数も分布をもち、医薬品として開発するための規格化が困難であった。そこで細胞外遺伝子操作によるペプチド合成法による修飾生理活性ペプチド合成すなわち修飾部位の特定化や導入数を計画的に決定できる精度の高い修飾ペプチド合成法の確立を目的とする。具体的には多くの情報を持っている PCBDNF の細胞外遺伝子操作による合成を計画した。

(3)再生医療において成長因子徐放機能を持つスキャホールドが求められている。その候補として生分解性ポリマーであるポリ乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) やガラクトアミノグリカン (コンドロイチン硫酸やヒアルロン酸) を用いた生理活性ペプチド徐放製剤を作製する。具体的には bFGF-ヒアルロン酸、insulin-PLGA、CXCR4 拮抗剤-PLGA 徐放製剤を作製検討する。

2. 研究方法

1) ペプチドのレシチン化

塩基性ペプチドである BDNF の場合 rhBDNF 溶液を pH11 としアミノ基モル数に対して 0.6 当量の 2-0-(4-hydroxybutyryl) lisophosphatidyl choline (PC) hydroxysuccineimide ester を氷冷下滴下後 1 時間攪拌し、氷冷下 over night 放置した。反応液を分子量 8,000 排除の限外ろ過膜を用いて未反応の試薬ならびに低分子量物質を除去後溶媒を 10 mM KH₂PO₄/H₃PO₄ (pH 3.0) 混液に置換し透明とした。2-0-(4-hydroxybutyryl) lisophosphatidyl choline の rhBDNF への結合割合は飛行時間型マスペクトル

(TOF-MALDI MS)により測定した。またHPLC (acetonitrile gradient elute)流出パターンを分析した。他のペプチドのレシチン化もこれに準じて行った。

2) PC-BDNF の in vitro 細胞増殖活性を trkB を発現させた PC12h 細胞 (PC-pAB1) を用いて MTT 法により測定し、PCBDNF と BDNF の活性を比較検討した。PCBDNF の PC-pAB1 細胞結合性：クロラミン T 法によりヨードラベル化した PCBDNF を用いて PC-pAB1 細胞への結合性を検討した。さらに放射活性 cold の BDNF を大過剰量添加することで細胞にすでに結合している 123I ラベル化 PCBDNF が置き換えられるかを測定した。PCBDNF による PC-pAB1 細胞の MAPK (ERK1/2) 活性化 (リン酸化) の時間経過をウエスタンブローディング法で検出した。

3) レプチン受容体異常肥満マウスである C57BL/Ksj-db/db 糖尿病マウス (♂、11 週齢) に PCBDNF および非修飾 BDNF を 5 日間背部皮下投与しマウスの摂食量、血糖値に対する効果を検討した。

4) ラット加重負荷外傷性脊髄損傷モデルにおいて PCSOD (iv) および PCBDNF (sc) の効果を検討した。ラットの T11 位に 25gr の錘で 5 分間負荷をかけた。30 分後 PCSOD、PCBDNF を投与した。その後、後足の運動機能、形態を観察し BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) スコアで評価した。

5) 細胞外遺伝子操作による修飾生理活性ペプチドの合成：リジンアミノ酸の α アミノ基を Boc で保護し ϵ アミノ基にレシチンを結合した α Boc-Lysine (PC) を作製した。 α Boc-Lysine (PC) に pdCpA を結合させ PC-Lysine-pdCpA とすることを試みた。この後、酵母 tRNA のアンチコドンに 4 塩基に対応に置き換え、T4-RNA Ligase により PC-Lysine-pdCpA と連結させる。一方 BDNF の cDNA についても PC-Lysine を導入する部分のコドンに 4 塩基配列で point mutation した cDNA を合成し、上記 tRNA と in vitro 翻訳系に入れ PCBDNF 合成を行う。

6) insulin および CRCX4 拮抗剤は溶媒除去法によって PLGA 製剤とした。bFGF はヒアルロン酸と亜鉛で結合体を作製した。

3 & 4. 研究成果と考察

(1) レシチン化生理活性ペプチド (PCSOD, PCBDNF) の評価

ラット脊髄損傷モデルにおいて PCSOD は脊髄損傷による機能低下の回復効果において有用性が示唆された。活性酸素が外傷性脊髄損傷に関与しているのではないかとの報告は以前よりなされていたが、PCSOD が有効であったことによりラジカルの関与が明らかになった。

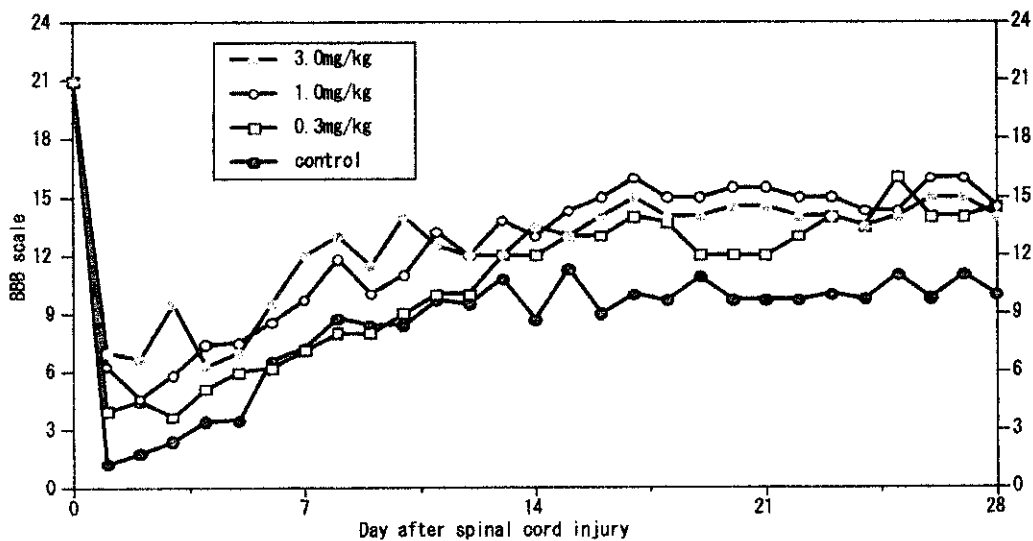


図1 ラット加重付加外傷性脊髄損傷モデルにおける PCSOD の効果

mean SD, N=14~±15

Wistar rat (♀、8w) の胸椎部 (T10~11) に 25 gr の錘を載せ 5 分間負荷をかけ、その 30 分後 PCSOD を投与し、その後 BBB スコアで運動機能を評価した。PCSOD 投与群は早い回復を示した。

外傷性脊髄損傷の治療薬としてはステロイドが第一選択肢で他に治療薬がないことから PCSOD が治療薬の選択肢を増やすことが期待される。

PCBDNFについて前年度はC57BL/Ksj-db/db miceを用いてPCBDNFの薬理活性を検討した結果、摂食抑制作用、血糖値低下作用、体重減少作用においてPCBDNFは強力な薬理効果を示し、用量から推定するとPCBDNFは非修飾BDNFより20倍も強力であり、その薬理効果の増強が何に起因するかについて検討を進めた。まず神経系細胞であるPC-pAB1に対するin vitro細胞増殖活性を測定したがPCBDNFの比活性は非修飾BDNFと同程度であった。さらに皮下投与後の血漿BDNF濃度および中枢神経系への集積を検討し非修飾BDNF投与群と比較した結果、非修飾BDNF投与群に比してPCBDNF投与群の血漿BDNF量がいずれの時間においても低く薬理効果の増強が血中半減期の延長によるものではないことを報告した。中枢神経系への集積性においてはPCBDNF投与群のほうが高い集積性を示す傾向は見られたが、中枢神経系へのターゲット性のみで薬理効果の増強が説明できるものではないと考えられた。そこで本年度はPC-pAB1細胞を用いて細胞親和性を検討した。その結果PCBDNFは細胞に強固に結合し、大過剰の非修飾BDNFを添加しても細胞から遊離しないといった結果が得られた。

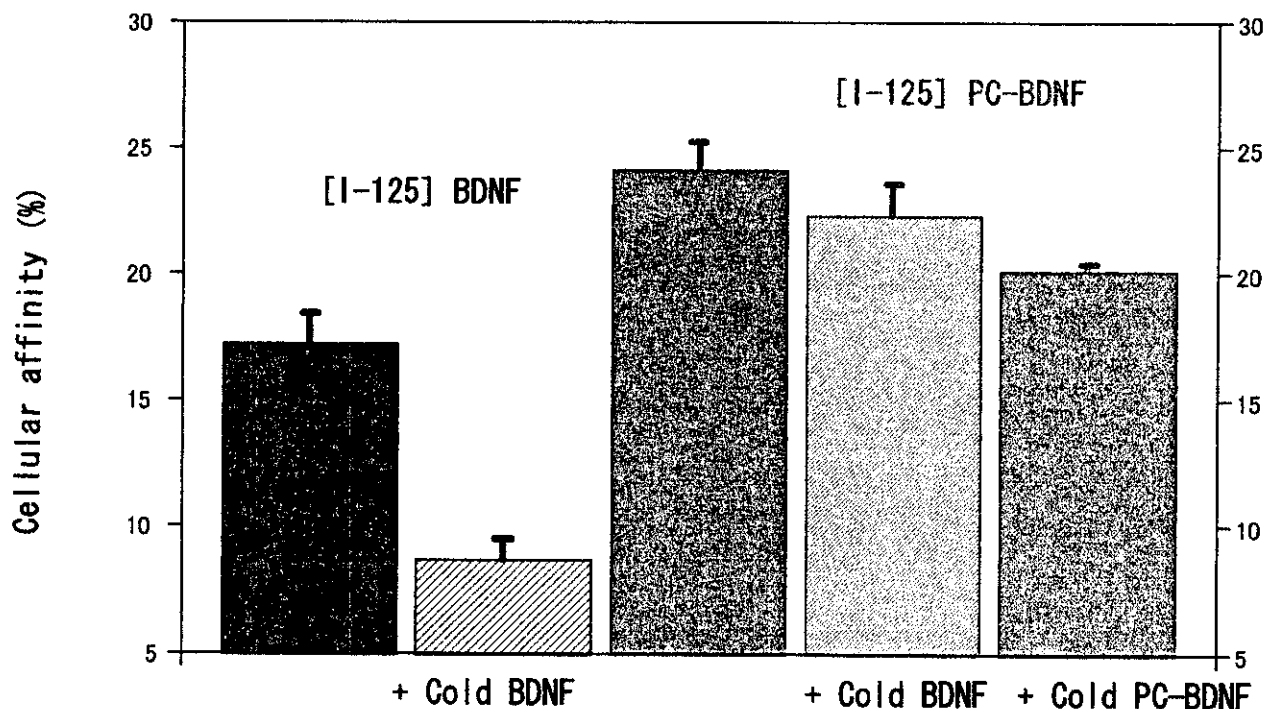


図2 [1-125] BDNF および[1-125] PC-BDNFのPC-pAB1細胞に対するbinding affinity

[1-125] PC-BDNF (300 ng/ml)のPC-pAB1細胞(trk B発現細胞)に対するbinding affinityを検討した。[1-125] PC-BDNFの細胞に対するbinding affinityは、[1-125] BDNFに比べて明らかに高かった。そこに大過剰のcold BDNF (300 μg/ml)添加後、細胞結合量を再度測定したところ、[1-125] BDNF添加群は著しい細胞結合BDNF量の低下がみられたが[1-125] PC-BDNF添加群ではほとんど結合量の変化がなかった。大過剰のcold PC-BDNF (300 μg/ml)を加えた場合も同様な結果が得られた。

さらに興味深いことにPCBDNF添加によりPC-pAB1細胞のMAPKリン酸化の持続が観察された。レシチンがアンカーとなって細胞に強固に結合する結果、MAPK活性化の持続化がみられると考えられるが長時間のMAPKリン酸化は細胞を分化に向かわせるとされ、PCBDNFの薬理効果増強の機序の一つが持続的なMAPK活性化に起因する可能性が示唆された。

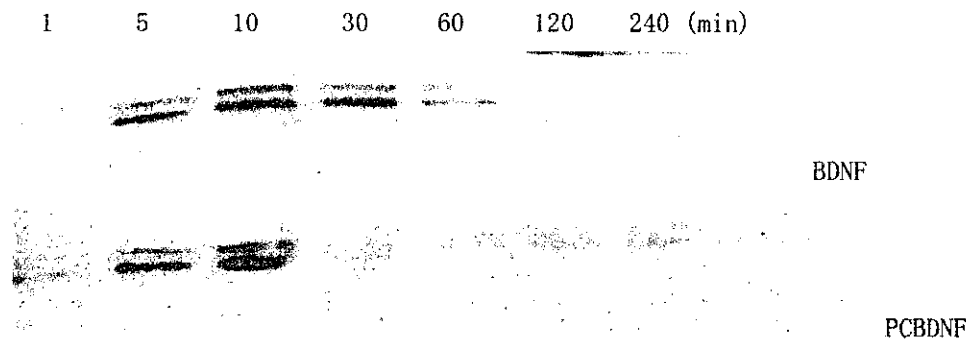


図3 ウェスタンブロッティングによるPC12h細胞のMAPK活性化
 BDNFおよびPCBDNFの添加濃度は300 ng/mlとした。それぞれの時間でのリン酸化MAPKをウェスタンブロッティング法で解析した。PCBDNF添加4時間後もリン酸化MAPKが明瞭に見える。

今後はp38活性化についても検討し細胞内シグナルに及ぼす影響を検討する予定である。BDNFは他の神経栄養因子とともに神経再生においても重要な役割を果たすと考えられるがBDNFそのままの形で投与しても十分な効果がえられない。PCBDNFは神経再生医療をはじめ中枢神経系領域の疾患にとって非常に有用性の高い製剤になりうることを期待される。今後PCBDNFの細胞内シグナル伝達に及ぼす影響やラット外傷性脊髄損傷モデル系における薬理効果（神経幹細胞移植との併用も含めて）を検討する予定である。

(2)細胞外遺伝子操作による修飾生理活性ペプチドの作製の予備検討として有機合成法により作製したPCBDNFをマスペクトルで分析した結果、有機合成法によるPCBDNFは下図のように1分子あたりのレシチン導入数が0~10分子の混合体であることが判明した。予想した以上にヘテロな生成物が合成されていることが判明し、有機合成法による問題点が浮き彫りにされた。このような混合物でも薬理活性の増強がみられることから最適修飾基導入数が判明すればより活性の高いPCBDNFが得られると考えている。HPLCで種々のピークを分取し、BDNF1分子あたり何分子のレシチンが導入されているPCBDNFがもっとも活性が高いかすなわちMAPK活性の持続が見られるか、あるいはC57BL/Ksj-db/db mice糖尿病マウスにおける摂食抑制効果が見られるかまたは細胞増殖活性やthymidine取り込みが高いかを検討中である。

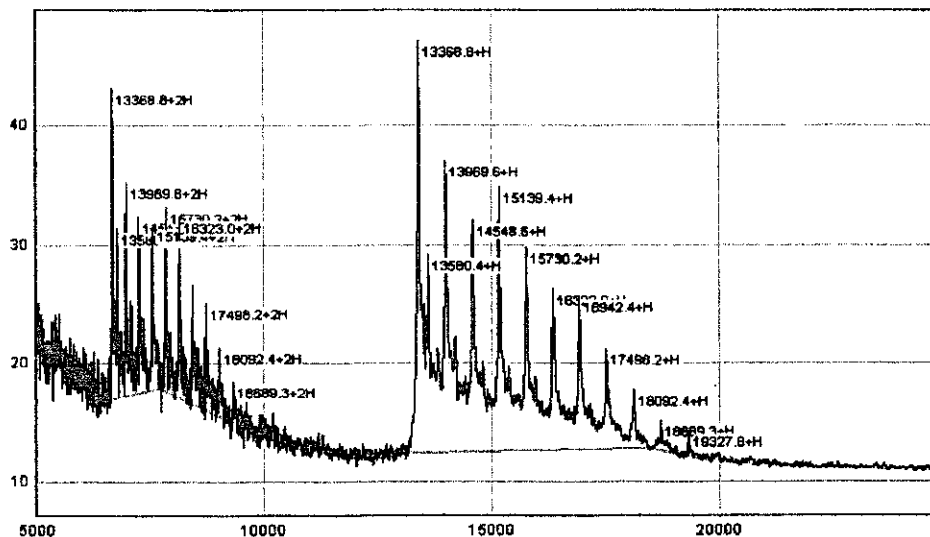


図4 有機合成法によるPCBDNFのマスペクトル

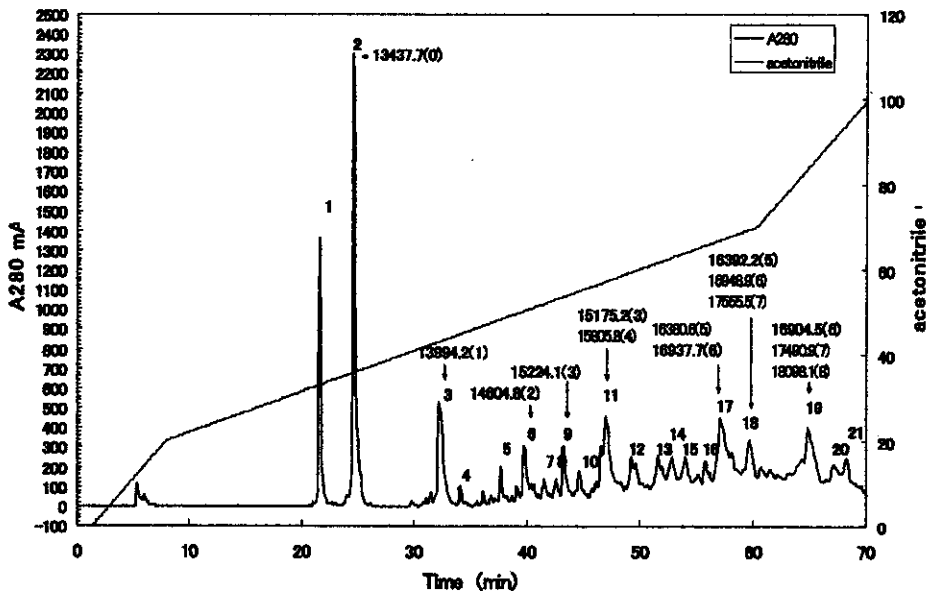
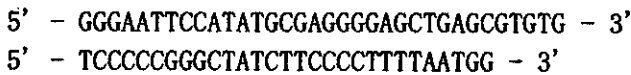


図5 有機合成法によるPCBDNFのHPLCパターン

細胞外遺伝子操作によるPCBDNFの作製を目的にまずコントロールとなるBDNFのcDNAクローン (Invitrogen, #4471857) をPCR法で無細胞タンパク質合成用plasmid (Roche Diagnostics, pIVEX2.3) にサブクローニングした。PCRの primer は、以下の配列の物を用いた。



pIVEX2.3 に挿入されたBDNF遺伝子配列に問題が無いことを確認した。

この plasmid を用いてラピッドトランスレーションシステム (E. coli HY kit) により BDNF の合成を行い、SDS-PAGE により BDNF が合成されていることを確認した。

| | | | | |
|------------|------------|------------|-------------|-----|
| 1 | 10 | 20 | 30 | 40 |
| HSDPARRGEL | SVCDSISEWV | TAADKKTAVD | MSGGTVTVLEK | |
| | 50 | 60 | 70 | 80 |
| VPVSKGQLK | QYFYETKCNP | MGYTKEGCRG | IDKRHWNSQC | |
| | 90 | 100 | 110 | 119 |
| RTTQSYVRAL | TMSKKRIGW | RFIRIDTSCV | CTLTIKRGR | |

図6 成熟型BDNFの1次構造

次にPCBDNFの作製のためにレシチン化Lysine (PC-Lysine) 合成を行った。まず、 α Boc-Lysine にPC化剤(レシチン誘導体スクシンイミドエステル)を反応させHPLC精製により α Boc-Lysine (ϵ -PC)を得た。

MALDI-TOFMSにより目的分子量836.8を確認した。次に α Boc-Lysine (ϵ -PC)とpdCpAとの結合を試みた。まずカルボジイミダゾールを用いて行ったが α Boc-Lysine (ϵ -PC)とpdCpAは結合しなかった。側鎖無保護のヒスチジンやアルギニンもこの方法では反応しないことが知られていることや、Lysineに結合したレシチンが邪魔をしている可能性もあるので、最初に α Boc-LysineとpdCpAに結合させその後レシチン化する方法で再度検討中である。最終的には細胞外遺伝子操作によりPC-lysineが組み込まれたPCBDNFを合成する。ペプチドを修飾することが生理活性に大きな影響を及ぼすことが危惧されることから最適部位に最適数の修飾基を導入することが必要であり、細胞外遺伝子操作による修飾生理活性ペプチド法はこの点利に適っている。またこの方法は計画的に修飾部位の特定化が可能であることから医薬品として修飾活

性ペプチドを合成する方法としては全く新規で画期的な技術となることが期待される。

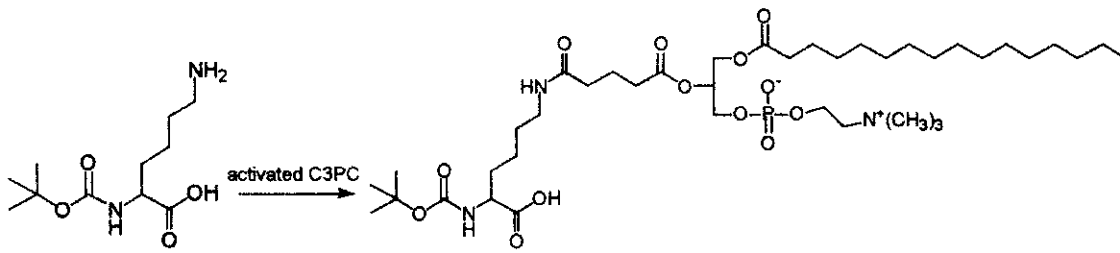


図7 レシチン化 Lysine 合成のプロセス

(3) 生理活性ペプチド徐放製剤として前年度は PLGA-insulin 製剤調製の際、insulin PLGA 懸濁油相に少量で適量のグリセリンと水を加えることで製剤はマイクロカプセル表面の insulin の局在が抑えられ、ストレプトゾトシン惹起糖尿病ラットに皮下投与 (250 U/kg) すると、初期のバーストが抑えられ、安定した血中 insulin 濃度 (30~100 μ U/ml) が長期間持続した。今年度は CXCR4 拮抗作用を持つ合成ペプチドについて PLGA 製剤を作製し、その薬理活性を CXCR4 を持ちそれがガンの肺転移とかかわりがあると報告されている B16-B16 メラノーマの転移抑制効果で検討した結果、徐放製剤とすることで有意なメラノーマ転移抑制活性が見られた。

ヒアルロン酸と亜鉛イオン、塩基性ペプチドである bFGF については結合体を作製し in vitro の細胞系において検討した。細胞周期を同調し検討したところ S 期の細胞においてこの製剤添加群は高い thymidine uptake を示し、さらにその結果高い VEGF の発現量が示された。bFGF-Zn-HA 製剤をラットに皮下投与すると約 1 週間皮下にとどまることが確認され、投与部位において著明な血管新生作用の増強がみられた。この製剤処方 HGF や BDNF などに応用可能な方法であり、PLGA 徐放製剤とともに再生医療における成長因子徐放性機能付加スキューホールドへの有用性が期待される。

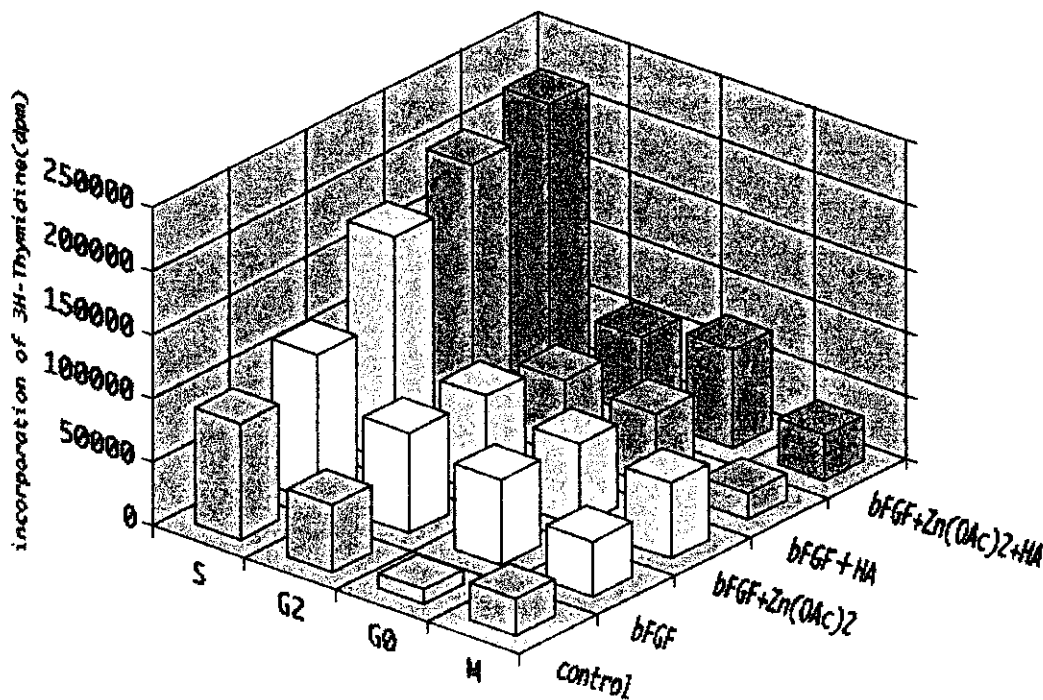


Fig. 8 Effect of the addition of bFGF(10ng/mL) complex on NIH-3T3 cell line in G0,G2,M and S phases of cell cycle. 10% FCS was added in medium after 15 hours and 3H-thymidine incorporation was countered after 45 hours from which each material was administered. N=3

5. まとめ

BDNF にレシチン誘導体を共有結合したレシチン化 BDNF (PC-BDNF) が、db/db マウスの摂食量抑制、血糖値低下作用において非修飾 BDNF より著明に強力な (約 20 倍) 薬理効果を示すが、PCBDNF は *in vitro* の細胞増殖活性において非修飾 BDNF と同等であり、かつ血中半減期の延長による薬理効果の増強ではないことも示唆された。薬理効果増強の機序について神経系ニューロン細胞 PC12h trk B transfected (PC-pAB1) を用いて検討したところ細胞への結合が強力であり、大過剰の BDNF の添加においても細胞への結合が阻害されないことが判明した。さらにウエスタンブロッティング法によって持続的な MAPK 活性化が証明され、レシチンがアンカーとなって細胞に強力に結合することで持続的な MAPK 活性化がみられその結果細胞分化が増強される可能性が示唆された。活性酸素が関与していると考えられる外傷性脊髄損傷モデルにおいて PCSOD が高い運動機能回復効果を示した。レシチン化の技術は HGF, NGF, GDNF, NT-3 などへも応用可能であり神経系の再生において有用性の高い基盤技術となると考えられる。

しかし有機合成法によるペプチド修飾は修飾部位が特定化できないことや導入数が分布をもつことから、レシチン化リジンを合成し細胞外遺伝子操作(4塩基コドンによる人工塩基導入)による PCBDNF 合成技術を立ち上げている。この方法では修飾部位が特化でき、医薬品としての精製、規格化の簡便性において非常に魅力的な方法である。

生分解性ポリマーである PLGA とヒアルロン酸をキャリアーとした PLGA-insulin、PLGA-CXCR4 拮抗薬およびヒアルロン酸-FGF 製剤を作製し徐放性とその効果を確認した結果、いずれも徐放効果により薬理効果の増強が得られた。この製剤は再生におけるスキャホールドとしても応用可能と考えられる。

以上のように臨床応用に向けて大きな可能性のある新規 DDS 技術の確立を推進している。

6. 研究発表

1. Takenaga M, Yamaguchi Y, Kitagawa A, Ogawa Y, Mizushima Y, Igarashi R. A novel sustained-release formulation of insulin with dramatic reduction in initial rapid release. *Journal of Controlled Release*, 79(1-3), 81-91, 2002
2. Takenaga M, Yamaguchi Y, Kitagawa A, Ogawa Y, Mizushima Y, Igarashi R. A novel insulin formulation can keep providing steady levels of insulin for much longer periods. *J Pharm. Pharmacol* 54, 1189-1194, 2002
3. Yamaguchi Y, Takenaga M, Kitagawa A, Ogawa Y, Mizushima Y, Igarashi R. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules-initial burst release controlled by the hydrophilic additives *J controlled Release*. 81, 235-249, 2002
4. 小川泰亮, 武永美津子, 山口葉子, 五十嵐理慧, 水島裕. 糖尿病治療学の進歩. 新規開発糖尿病治療薬の現況と今後の展望. インスリン製剤開発動向. インスリン基礎分泌を補完する徐法性マイクロカプセル製剤. *日本臨牀* 60(増9)「新時代の糖尿病学(3)」, PP 542-547, 2002
5. 五十嵐理慧, 武永美津子, 山口葉子, 上野幸生, 北川晶, 水島裕. 特集Ⅱ: 血管新生療法の基礎と臨床. 血管新生療法を支える技術② 再生医学を支える DDS 技術. *炎症と免疫* 10(6), 652-658, 2002

6. 知的所有権の取得状況

なし