薬 剤 学, **68** (1), 32–36 (2008)

≪若手研究者紹介≫

# PEG 修飾リポソーム 2 回投与における ABC 現象発現のメカニズムに関する研究

王　　新　宇　Xinyu Wang
大塚製薬株式会社

## 1. は　じ　め　に

筆者がリポソームと出会ったのは，大学 4 年生のときだった．すぐにその薬物キャリアとしての可能性に魅力され，7 年前に仕事を辞め，日本へ留学することになって念願のリポソーム研究を始めた．これから紹介する研究は筆者が学生時代から現職となるまで徳島大学薬学部の際田弘志教授および石田竜弘準教授の指導のもとに行った研究の一部である．

脂質二重膜からなるリポソームは，1965 年に Bangham によって発見されて以来，幅広い分野で注目されてきた．その生体適合性が優れ，調製が容易であり，脂溶性薬物でも水溶性薬物でも封入できるなどの理由から，薬物送達システム（DDS）として多くの研究が進められている．従来のリポソームは生体内での不安定性や静脈内投与後の内封物漏出および細網内皮系（RES）への取り込みが問題となる．これらの問題を解決するため，ポリエチレングリコール（PEG）表面修飾リポソーム（PEGylated liposome，STEALTH liposome(SL)）は，RES 回避可能な画期的な長期血中滞留型リポソームとして開発された[1]．SL はリポソーム表面の PEG により形成される水和層およびその立体障害により，血清蛋白の吸着が抑えられ，単球食細胞系に認識されにくく，血中滞留性を高めていると考えられる．このような PEG 修飾リポソームのドキソルビシン封入体がすでにアメリカ，ユーロッパおよび日本で市販された．

ところで，薬物キャリアの SL は医薬品として医療現場に使用された場合，どの状況において生体内投与されても同様な体内動態を示さなければならない．このような観点から，筆者らは SL を頻回投与時の体内動態変化についての研究を始めた．その結果，SL を 1 回目投与後にある投与間隔で 2 回目投与を行うと，2 回目投与された SL の血中滞留性が低下し，肝臓への蓄積が亢進する現象を発見した[2]．筆者らはこの現象を Accelerated Blood Clearance 現象，以下 ABC 現象と略し，その発現メカニズムの解明を試みた．

## 2. 研　究　成　果

ABC 現象発現の要因としては，1 回目投与後 SL 自体の変化（PEG 誘導体の脱離など）或いは 1 回目投与により誘導された生体側の変化(免疫反応など)が関与すると考えられる．しかし，筆者らが使用した PEG-DSPE は，リポソーム膜にしっかりと固定され，膜脱離半減期は約 70 時間と報告されている．仮に PEG の脱離が生じるとしても，PEG を失った SL の物理化学性質は通常のリポソームとほぼ同様であり，ABC 現象発現の要因だと考えにくい．従って，生体側の要因は ABC 現象発現に重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる．オランダの研究グループは SL 投与 1 週間後のラットの血清を採取し，この血清を無処置ラットに輸注し，

筆者紹介：1999 年中国瀋陽薬科大学薬学部卒業，2007 年徳島大学大学院薬科学教育部医療生命薬学専攻博士後期課程修了，博士(薬学)取得．2007 年 4 月より現職(大塚製薬株式会社)．2007 年日本薬剤学会第 32 回製剤セミナー Postdoctoral Presentation Award 受賞．研究モットー：Evidence-Discussion- Evidence-Discussion．趣味：サッカー，釣り，焼酎鑑賞．

ABC 現象が無処置ラットにおいて再現された．筆者らは同様な実験を行って同様な結果が得られた．そこで，筆者らはSL1回目投与後に分泌された血清因子をフォーカスし，ABC 現象との関連について詳細な検討を行った．

### 2.1　IgM および補体系の関与

一般的にリポソーム表面に結合した血清蛋白がリポソームの体内動態変化に重要な役割を果たしていることが報告されている．SLの表面にPEGが存在していることから，血清タンパクが結合しにくいと考えられる．しかし，最近の研究からPEGの存在が血清タンパク（補体系）の結合をある程度抑制するが，完全に抑制できないことが分かった．そこで，SL表面の結合タンパクに関してSDS-PAGEを行い，特異的な結合タンパクの有無について検討を行った．その結果，コントロール（無処置血清とインキュベーションしたSL表面の結合タンパク）と比べSL投与5日後の血清とインキュベーションしたSL表面に特異的なバンドが7本検出された．これらのバンドに関してLC-MS/MSを用いて分析した結果，特異的なバンドに含まれるタンパクは，そのほとんどがイムノグロブリンのフラグメントと補体系成分に属するものであることが分かった．イムノグロブリンには種々のサブクラスがあるが，リポソームの体内動態に影響を与えることが知られているのはIgGとIgMのみである．そこで，LC-MS/MSにより示されたイムノグロブリンが，どちらのクラスに属するものであるかを特定するために，ウェスタンブロットを行った．その結果，SL結合タンパク中にはIgGの存在を顕著に示さず，IgMが大量に含まれていることが明らかとなった[3]．

IgMは一般的にマクロファージ上のFc受容体を介して異物の取り込みを直接促進することができず，補体系を活性化させ，マクロファージ上の補体受容体を介して間接的に異物の取り込みに寄与すると知られている．そこで，IgMがSL表面に結合したことによって実際に補体系の活性化が生じるか検討した．その結果，IgMがSL表面に結合することによって補体の活性化が生じたことが分かった[4]．以上から，2回目投与SLはマクロファージに補体受容体を介してクリアされると考えられる．

### 2.2　IgM の特異性

以前，リポソームの投与により，コレステロールやリン脂質などのリポソームの構成成分に特異性を

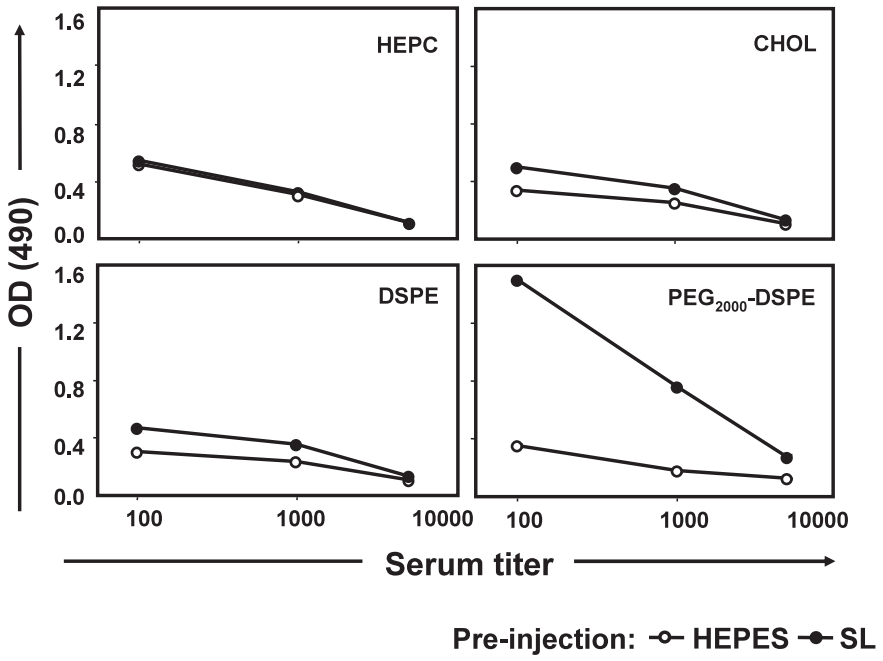


Fig. 1.　IgM Titers against Liposome-Containing Lipid Components.
The injection of SL induces IgM response against HEPC, CHOL, DSPE and $PEG_{2000}$-DSPE. Serum IgM against liposome component was measured 5 days after the first injection. Each value represents the mean ± S.D. of three separate experiments.

示した抗体が分泌される報告があった．そこで，SL1回目投与後に誘導されたIgMがSLの構成成分であるCholesterol，HEPC，DSPEおよび$PEG_{2000}$-DSPEに対する特異性を検討し，結果をFig. 1に示した．SL投与後に誘導されたIgMはCholesterolやDSPEに親和性を示したものの，顕著ではなかった．一方，$PEG_{2000}$-DSPEに顕著な親和性を示したことから，誘導されたIgMはPEG鎖に特異性を持つことが示唆された．また，このIgMはほかのPEG誘導体およびPEG修飾BSAにも特異性示したことからも，その特異認識部位はPEG鎖であることが支持された．

### 2.3 IgMの誘導機構

リポソームは一般的に生体適応性が優れ，抗原性が低いと言われている．このように免疫反応を誘導されたことがすごく不思議な現象だと思われる．一方，以前からリポソームは一種のT細胞非依存性抗原である報告があったが，その免疫機構について検討されなかった[5]．当時のリポソームの脂質組成，サイズ，表面修飾などはSLとは大いに異なるので，SLはT細胞非依存性抗原として免疫システムを誘導したか検討するためヌードマウスを用いて検討した（Fig. 2）．BALB/cヌードマウスにSLを投与し，その10日後に，マウスの血清を採取し，血清中のAnti-PEG-IgMの量を測定した．その結果，ヌードマウスにおいてPEGに特異的なIgMの分泌も誘導された．ヌードマウスはT細胞機能が欠損したものの，B細胞機能が正常である．SLはT細胞依存せず，B細胞を活性化し，IgMの分泌を誘導したことから， SLはT細胞非依存性抗原であることが明らかとなった．

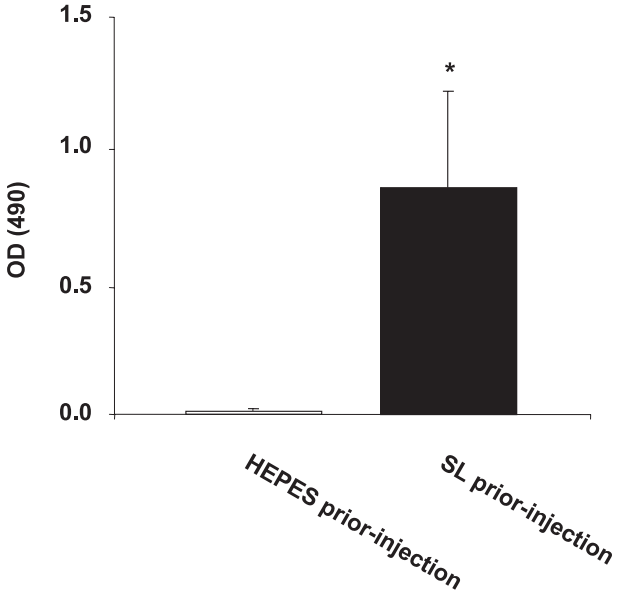


Fig. 2. IgM Response after the SL Injection in Nude Mice.
The immunodeficient athymic BALB/c (nu/nu) mice were injected with HEPES (□) or a dose of SL(■), 10 days later, blood was sampled, and IgM response against $PEG_{2000}$-DSPE was assessed by ELISA. Each value represents the mean ± S.D. of three separate experiments. $p$ values apply to differences between HPPES and SL treated mice. *$p < 0.05$.

生体免疫システムは外来抗原に対して早期の自然免疫と後期の獲得免疫機構により，外来抗原を除去して生体を守ると言われている．最近の研究で，このような自然免疫と獲得免疫を繋ぐ，T細胞非依存性抗原に対する免疫反応が存在していることが報告された．この反応に中心的な役割を果たしている免疫細胞は脾臓の辺縁帯に存在する辺縁帯B（Marginal zone，MZ-B）細胞と腹腔内に存在するB-1B細胞である[6]．筆者らは脾臓が主要な免疫担当臓器であり，しかも唯一血流中の抗原と反応できる免疫臓器であることに着目した．そこで， SL初回投与前に脾臓を摘出することによって，ABC現象の発現およびAnti-PEG-IgMの分泌への影響を検討した．その結果，脾臓非存在下ではABC現象の発現およびAnti-PEG-IgMの結合量は大いに抑制された．この結果と前の考察と合わせて考えると，脾臓のMZ-B細胞はAnti-PEG-IgMの分泌に関与する免疫細胞である可能性が高いことが示唆された．辺縁帯は脾臓の赤脾髄と白脾髄の移行部となる区域である．辺縁帯においてMZ-B細胞を初め，マクロファージや樹状細胞などの免疫担当細胞が存在する．また，辺縁帯内の血流量は遅く，血液由来の外来抗原や異物が最初に脾臓実質に接触するところであり，免疫反応の重要な場所の一つである．

MZ-B細胞の更新速度は一般B細胞と比べ非常に遅い，これを利用してシクロホスファミド処理によって選択的に枯渇することができる[7]．ラットにシクロホスファミドを腹腔内投与し，その後にSLを静脈内に投与した．5日後，ラットの血清を採取し，ELISA法によりAnti-PEG-IgMの量を測定した．シクロホスファミド処置したラットにはanti-PEG-IgMの分泌が抑制された．この抑制された

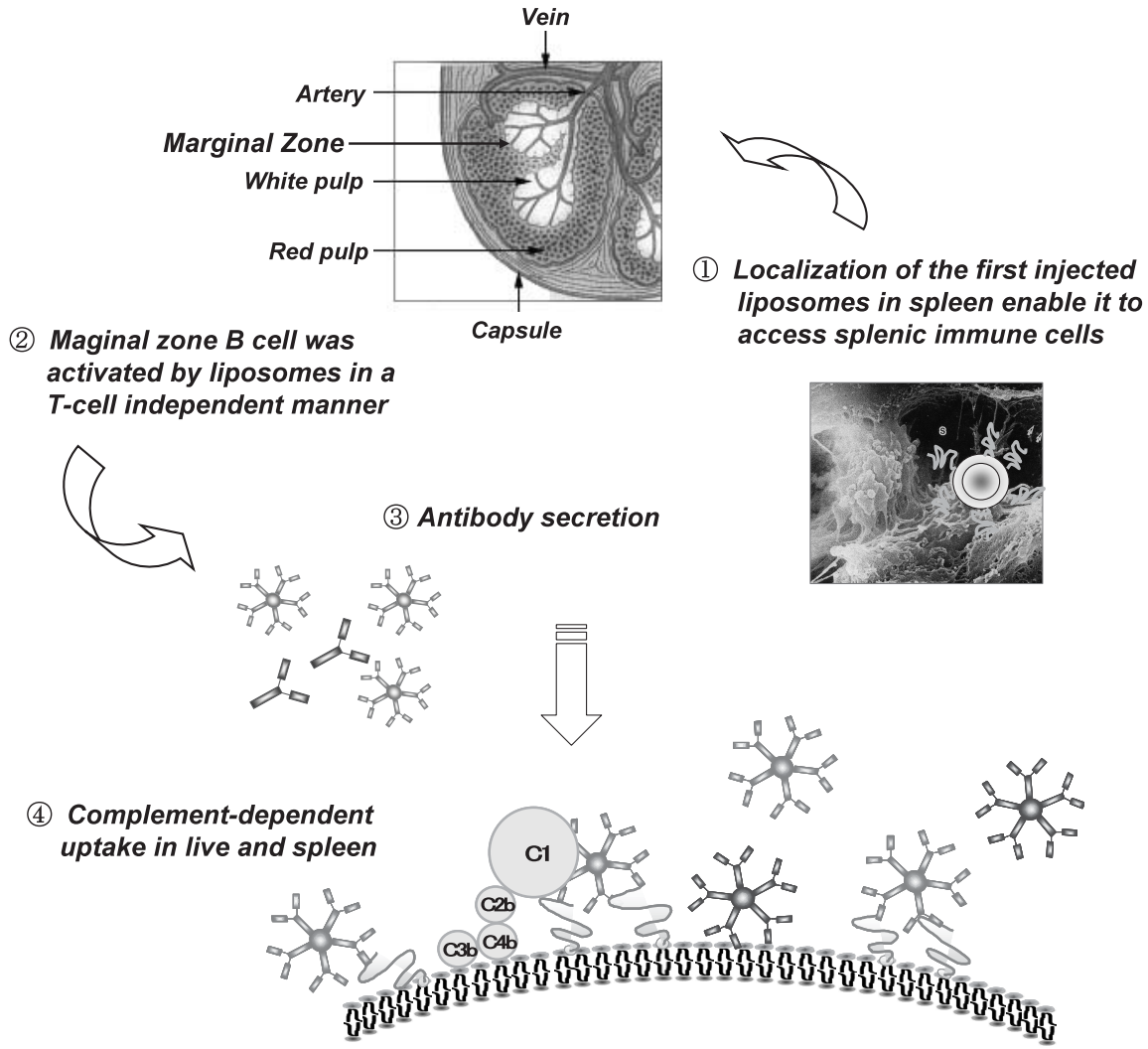


Fig. 3. The Mechanism of the Accelerated Blood Clearance Phenomenon.

IgM の分泌はシクロホスファミド処理により枯渇された MZ-B 細胞が関与していることが強く示唆された．

### 2.4 結　　論

以上の検討から，1 回目投与 SL は T 細胞非依存的に B 細胞を活性化し，PEG に特異的な IgM の分泌を誘導する．SL に結合した IgM は補体系を活性化することにより，マクロファージは補体受容体を介して，2 回目投与 SL を血中からクリアすることが ABC 現象発現のメカニズムと考えられる（Fig. 3）．本研究で得られた知見から，DDS の開発にあたり免疫学の観点から DDS 安全性の再評価が必要であることが示唆され，今後の DDS の開発・臨床応用に重要な参考になると考えられる．

## 3. 終　わ　り　に

5 年間この研究テーマを通じて，研究者としての初めの一歩を踏み出したと思う．製薬企業において，候補化合物の物性を基づいてそれぞれの化合物に合う，化合物の活性を最大限に発揮できる製剤設計をしなければならない．そのため，DDS に関して多種多様な DDS 技術蓄積が必要である．これからこの 5 年間の自由な研究経験を生かして今後企業の製剤研究に貢献したいと思う．

本研究に際して終始ご指導，ご鞭撻を賜りました徳島大学・際田弘志教授，石田竜弘準教授に衷心より深甚なる謝意を表すとともに，有益なるご助言を頂いたほかの先生方に心より深謝いたします．また，数々のご協力を頂いた先輩，後輩に深く感謝い

たします.

## 引 用 文 献


1) T.M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, A. Yau-Young, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1066**, 29–36 (1991).
2) T. Ishida, R. Maeda, M. Ichihara, K. Irimura, H. Kiwada, Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections, *J. Control. Release*, **88**, 35–42 (2003).
3) T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima, H. Kiwada, Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes, *J. Control. Release*, **112**, 15–25 (2006).
4) X. Wang, T. Ishida, H. Kiwada, Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes, *J. Control. Release*, **119**, 236–244 (2007).
5) D.M. Mosier, B. Subbarao, Thymus-independent antigens: Complexity of B lymphocyte activatin revealed, *Immunol. Today*, **3**, 217–222 (1982).
6) F. Martin, J.F. Kearney, Marginal-zone B cells, *Nat. Rev. Immunol*., **2**, 323–335 (2002).
7) D.S. Kumararatne, R.F. Gagnon, Y. Smart, Selective loss of large lymphocytes from the marginal zone of the white pulp in rat spleens following a single dose of cyclophosphamide. A study using quantitative histological methods, *Immunology*, **40**, 123–131 (1980).