脂質を用いた活性蛋白のターゲット療法

symposium

活性ペプチドの DDS

Drug Delivery System

五十嵐理恵・水島 裕*

Biological active peptides conjugated with lecithin for DDS

Human IgG, which was used as a model of biological active peptides, was conjugated with lecithin. The lecithinized IgG showed a high accumulation in several organs in C₃H mice following intravenous injection. Moreover, it showed a high affinity to human lymphocytes, MM46 and Sarcoma 180 cancer cells. Particularly, the affinity of lecithinized IgG to MM46 and Sarcoma 180 cancer cells was about 6~7 times as high as IgG only or the mixture of IgG and lecithin.

In preliminary study, the lecithinized IgG accumulated higher in the injured arterial vascular lesions of SHR than that of normal rat. IgG showed the same accumulation into injured and normal arterial vascular lesions.

The property of lecithinized IgG is similar to that of lipid microsphere with a 0.2 μ m diameter in terms of tissue distribution

SOD was conjugated with lecithin by the same method for IgG. The activity of the lecithinized SOD was not decreased in xanthine-xanthine-oxidase-cytochrome C method.

The lecithinization of biological active peptides would be an effective DDS in the clinical application.

Rie Igarashi・Yutaka Mizushima*

key words: DDS, biological active peptide, lecithinization, lecithin

近年、バイオテクノロジーの進歩などにより、多くの生物活性ペプチドの大量生産が可能となり¹⁾、臨床応用が期待されている。これらバイオ医薬品の共通の問題点としては、半減期が短い、標的臓器・病変部への選択性がない、細胞親和性・組織親和性が低い、という点があげられる。それ

図1 レシチン化活性蛋白と lipid microsphere

ゆえ、临床上十分な効果をあげるには、DDSの導入が必要となる。これまで、筆者らが、PGE₁や prostacyclinなどの低分子薬物のキャリアとして用い^{2,3)}、成果をあげてきた直径0.2 μ mの lipid microsphere (LM)は、生体内において動脈硬化部、血栓部、骨髓、炎症部に集積する⁴⁾ことから、ウロキナーゼ、TPA、EPO、CSF、SODなどの薬物キャリアとしてLMが適していると考えられた。そこでこれまで、N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, N-succinimidyl S-acetylthioacetate, cyanuric chlorideをスプレーサーとし、LMと活性蛋白の共有結合を試みたが⁵⁾、蛋白分子の立体的な大きさから数100 μ g/mlが限度であること、さらにグリセリン水中に蛋白分子が存在することになり活性蛋白の安定性においても問題があり、LMと活性蛋白を結合させた lipo-活性蛋白は成功しなかった。

今回、それにかわる方法としてレシチン(phospholipid)を蛋白のまわりに共有結合させる方法を検討した。図1に示したように蛋白の周りにレシチンを共有結合させると、大きさは当然LMに比較して小さいが、LMとよく似た構造となるので、生体内動態をLMに近づけることが出来るのではないかと考えられた。また、この方法であれ

* Department of 1st Internal Medicine, St. Marianna University, School of Medicine 聖マリアンナ医科大学 第一内科学教室

ばレシチン化活性蛋白の凍結乾燥も可能となるので、活性蛋白の安定性においても問題がなくなることになる。

まず、human IgG を用いてレシチンを共有結合させ、生体内動態、細胞親和性を検討した。さらに同様に SOD にレシチンを共有結合させ、SOD 活性が残存しているかを調べた結果を報告する。

材料と方法

(1) 材料

amidol, perchloric acid, trifluoroacetic acid, cytochrome C (from bovine heart type V), xanthine oxidase (EC. 1. 1. 3. 22, 0.25 U/mg), xanthine, 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) は Sigma (USA) から、Ficoll Paque は Pharmacia (Sweden) から、RPMI 1640 は GIBCO (USA) から、fetal bovine serum (No. 33510, lot. 1-1038) は免疫生物研究所(群馬)から、C₃H/HeNCrj mouse (6w, ♂) は日本生物材料(東京)から、¹²⁵I-IgG (4 μCi/μg) は第一化学薬品(東京)から、human IgG, LYO (64-145, lot No. 050G) は生化学工業(東京)から、cyanuric chloride は和光純薬工業(大阪)から、それぞれ購入した。

SHR-SP (16w, ♂) (新日本動物) は、大正製薬(株)から提供を受けた。SOD は、Bovine 由来のもので 3000 U/mg の SOD を日清製粉(株)から提供を受けた。

(2) アミノ化レシチン調製

IgG と結合させたレシチンは、以下に示したように 2 位のカルボニル基の側鎖の末端にアミノ基を導入したリン脂質で、t-Boc で NH₂ を保護した t-Boc-aminophosphatidylcholine (t-Boc アミノ化レシチン) の合成を浜理薬品(大阪)に依頼した⁶⁾。化合物については、IR, NMR, TLC で確認している。使用直前につぎのように t-Boc をはずして用いた。

なお、t-Boc (tertial butoxy carbonylate) をはずす方法は、常法によった⁷⁾。簡単に述べると、t-Boc アミノ化レシチン 0.1 gr (0.13 mmole) を 1 ml の trifluoroacetic acid (TFA) に溶解し、室温で 1 時間攪拌後 TFA を完全に減圧留去し、蒸留水 1 ml に溶解し粉末 Na₂CO₃ で中性とした後

凍結乾燥して用いた。

(3) レシチン化 IgG の合成法(IgG とアミノ化レシチンの結合法)

① 水溶性カルボジイミドを用いる方法：ペプチド合成でよく用いられる方法で⁸⁾、簡単に述べると、IgG 1 mg (6.6 nmole)/500 μl 0.01MPBS pH 7.2 とアミノ化レシチン 4.2 mg (6.6 μmole) を室温下攪拌し、そこへ 1-ethyl-3-(3-dimethyl-amino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) 1.3 mg (6.6 μmole) を粉末のまま添加し、マイクロコルベン中室温下 7 時間反応させた⁸⁾。反応中 pH 6~7 に保った。

② 塩化シアヌルを用いる方法：これも既に述べられている方法に準じて行った⁹⁾。簡単に述べると、アミノ化レシチン 4.2 mg (6.6 μmole) を蒸留水 200 μl に溶解し、塩化シアヌル 1.2 mg (6.9 μmole, 61 mg cyanuric chloride/200 μl DMF を 4.2 μl) を添加し、Na₂CO₃ 粉末でほぼ pH 7.0 として、マイクロコルベン中 1 時間攪拌し、IgG 1 mg (6.6 μmole/500 μl 0.01 M PBS pH 7.2) を加えて、さらに 2 時間反応させ、反応液と同量の蒸留水を添加し、4 °C に一夜おいた。

①②両方法とも反応後 0.01M PBS pH 7.2 中で透析した。

(4) SOD のレシチン化

① カルボジイミド法：アミノ化レシチン 48 mg (0.079mmole)/500 μl 蒸留水と SOD 5 mg (0.32 μmole)/蒸留水 500 μl を混合し、EDC 15 mg (0.08 mmole) を粉末のまま加えて室温下一夜反応させた。

② 塩化シアヌル法：アミノ化レシチン 48mg (0.079mmole)/500 μl 蒸留水を氷冷し、塩化シア

ヌル溶液 (29.8mg cyanuric chloride/DMF 100 μ l) を 50 μ l 添加し, pH を 6.5~7 に保ち, 1 時間後 SOD 5mg/500 μ l 蒸留水を添加し, pH 7.0 室温で 2 時間反応させた。

上記の反応液を 0.01 M PBS で透析したあと, SOD 活性を測定した。

(5) リン(P)の定量

Bartlett のマイクロ法に沿って行った¹⁰⁾。すなわち, 検体の溶媒を留去し 0.4 ml の過塩素酸を加えて分解する。蒸留水 4.0 ml, モリブデン酸アンモニウム 0.2 ml とアミドール溶液 0.2 ml を加え沸水浴上で 7 分間加熱する。冷却 15 分後 830 nm で吸光度を読み取る。別に, 標準直線を引き, 検体の含有 P 量を読みとる。

(6) SOD 活性測定法¹¹⁾

0.15 mM cytochrome C/50 mM リン酸カルシウム buffer (pH 7.8), 0.5 mM xanthine/50 mM リン酸カルシウム buffer, 0.25 U/ml xanthine oxidase/50 mM リン酸 buffer pH 7.8 を作製した。50 mM リン酸カルシウム buffer (pH 7.8) 830 μ l, に cytochrome C 溶液を 100 μ l, xanthine 溶液を 50 μ l 添加混合し, 分光光度計 (Hitachi, U-2000) にて 550 nm の吸光度を測定し, ④とした。

この混合液に xanthine oxidase 10 μ l および検体 10 μ l を添加し, 室温 30 分後の 550 nm の吸光度を測定し ⑤とした。つぎに検体のかわりに 50 mM リン酸カルシウム buffer 10 μ l 添加したものの室温 30 分後の吸光度を ⑥とした。

$$(\text{⑤} - \text{④}) / (\text{⑥} - \text{④}) \times 100\%$$

の式を用いて xanthine oxidase が xanthine から $\text{O}_2\cdot$ を放出するのに対する阻害率を求めた。50% 阻害率を示すのが, SOD 1U である。

(7) レシチン化 IgG の C₃H/HeNCrj mouse 体内分布

C₃H mouse を 4 群にわけ, ^{125}I -IgG, ^{125}I -IgG+ 反応に用いた同量のアミノ化レシチン混合と上記の方法で作成したレシチン化 ^{125}I -IgG 2 種 (カルボジイミド法, 塩化シアヌル法) をそれぞれ IgG として 50 μ g (0.5 μ Ci/200 μ l 0.01 M PBS pH 7.2) を C₃H mouse の尾静脈から静注した。4 時間後と 24 時間後脱血し, 肺臓, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓を摘出し, 重量を測った後, 栄研チューブ 2

図 2 Sepharose, 4B column chromatography of lecithinized ^{125}I -IgG
column: 0.8×45 cm
buffer: 0.01 M Borate, pH 8.0,
0.8 ml/tube

号に入れ, Aloka auto well gamma system で各臓器に取り込まれた ^{125}I -IgG の radioactivity を測定し, 臓器 1 gr 当りに取り込まれた ^{125}I -IgG 量の全投与 ^{125}I -IgG に対する % を算定した。

なお, (7)C₃H mouse 体内分布および (8)SHR の動脈病変部への移行の実験, (9)細胞親和性は (3)の方法で ^{125}I -IgG をレシチン化した反応液を透析し用いた。

(8) SHR の動脈病変部への移行

レシチン化 ^{125}I -IgG 100 μ g (1 μ Ci/500 μ l 0.01 M PBS pH 7.2/匹) を rat に静注し, 3 時間後, 大動脈部を摘出し (7)と同様の方法で ^{125}I -IgG radio activity を測定し, 動脈部に取り込まれている ^{125}I -IgG 量を投与 ^{125}I -IgG 量に対する % であらわした。

(9) レシチン化 IgG の細胞親和性

健康人末梢血から Ficoll Paque を用いて常法によりリンパ球を分取し, RPMI 1640 (10% FCS) 中 2×10^6 cell/ml に浮遊させ, この浮遊液 1 ml に対してレシチン化 ^{125}I -IgG 10 μ g/40 μ l 0.01 MPBS を添加し, CO₂ インキュベーション 3 時間後生食で 4~5 回洗浄し, リンパ球と結合している ^{125}I -IgG を count し, 全投与量に対する % を算定した。この測定値は, リンパ球に取り込まれている IgG 量とリンパ球表面に結合している IgG 量の和をあらわし, これをもってリンパ球親和性とした。

** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$ (ともにIgG単独, IgG+レシチン混合に対して)

図3 レシチン化 ^{125}I -IgG の C_3H マウス体内分布 (i. v. 4 hr. 後)

図4 レシチン化 ^{125}I -IgG の C_3H マウス体内分布 (i. v. 24 hr. 後)

mouse の MM46 癌細胞および Sarcoma 180 癌細胞をそれぞれ RPMI 1640 (10% FCS) 中に 5×10^6 cells/ml となるよう浮遊させ、以下は上記のヒトリンパ球におけると同様、レシチン化 ^{125}I -

IgG を添加し、上記と同様の操作を行って、MM46 癌細胞、Sarcoma 180 癌細胞に対する親和性を測定した。

図 5 affinity of lecithinized ^{125}I -IgG to human lymphocytes

図 7 affinity of lecithinized ^{125}I -IgG to Sarcoma 180 cancer cells

結 果

レシチン化 IgG 合成反応液を透析後 Sepharose 4B column chromatography (0.8 $\times$ 45 cm) を 2 回繰り返すことにより, IgG の単一ピークを得た。これとともに行ったレシチンの存在を示すリン(P)の定量のピークとも一致した(図 2)。カルボジイミド縮合法によるレシチン化 IgG は, IgG 1 分子に対し約 60 個のレシチンが結合しており, 塩化シアヌル法によるレシチン化 IgG は IgG 1

図 6 affinity of lecithinized ^{125}I -IgG to MM-46 cancer cells

図 8 SHR 動脈病変部への ^{125}I -IgG とレシチン化 ^{125}I -IgG の移行

分子に対し約 30 個のレシチンが結合していた。

得られたこのレシチン化 IgG の C₃H mouse 体内分布をみると 4 時間後は図 3 に示すように IgG 単独, IgG+反応に用いたと同量のアミノ化レシチン混合の対照に比較して, カルボジイミド法に

表1 レシチン化 SOD の活性

SOD	SOD 活性 (xanthine-xanthine oxidase 系)
	100
レシチン化 SOD	
カルボジイミド縮合	100±3
塩化シアヌル法	98±2

(N=4) (mean±SE)

よるレシチン化 IgG の臓器移行性が、特に腎臓、肝臓、脾臓において高かった。

臓器濃度対血液濃度の比をとってみると、レシチン化 IgG の臓器移行性が著しいことがわかる。24 時間後の体内分布も全体に濃度は低くなっているが、同様の傾向がみられた(図4)。塩化シアヌル法によるレシチン化 IgG は、体内において結合が切れるなどの理由のためか、free の IgG と組織分布はあまり差がなかった。それゆえ、以下の細胞親和性などの検討はカルボジイミド法によるレシチン化 IgG を用いてのみ検討を行った。

細胞親和性の検討において、ヒトリンパ球に対する親和性は図5に示したごとく、レシチン化 IgG は対照の IgG 単独、IgG+アミノ化レシチン混合に比して2倍の高さを示していた。また、MM46 癌細胞、Sarcoma 180 に対する親和性は図6、7に示したように、レシチン化 IgG は対照にくらべて約6~7倍の親和性の高さを示した。

さらに、preliminary な検討であるが、SHR の動脈病変部への移行を比較してみると、図8に示したように IgG 単独では正常 rat の動脈部、SHR 動脈部への移行量が変わらないのに対し、レシチン化 IgG では、SHR の動脈病変部への移行率が正常 rat 動脈部への移行率よりかなり高かった。

IgG とまったく同様の方法で Bovine SOD にレシチンを共有結合させ、SOD 活性を測定したところ表1に示すごとく、ほぼ100%の活性が残存していた。SOD に関しては、SOD 1分子にいくつのレシチンが結合しているのかは現在検討中である。

考 察

活性蛋白の DDS としては、蛋白に PEG, SMA, 多糖体などの高分子を結合することが試みられている。いずれにしても、蛋白を修飾することによ

り、従来の活性蛋白の activity が損われてはならないし、新しい副作用を生ずることは出来るだけ避けねばならない。そういう点から、蛋白修飾のために導入する物質は蛋白の組織親和性を高め、生体内動態にターゲット性を持たせうるものであるとともに、生体内で分解されうる毒性の少ないものが望まれる。かかる物質の一つとして、われわれは lipid microsphere (LM) を考えた。しかし、冒頭で述べたごとく、LM と活性蛋白の結合は結合量と活性蛋白の安定性に難点があり、それにかわる方法として phospholipid (レシチン) を蛋白の周りに共有結合させた(図1参照)。

まず、IgG で検討したところ、レシチン化 IgG は、C₃H mouse 体内分布において高い臓器移行性を示した。さらに、ヒトリンパ球、MM46 癌細胞、Sarcoma 180 癌細胞に対して高い親和性を示した。特に、MM46 や Sarcoma 180 などの癌細胞に対するいちじるしい親和性の高さは癌細胞が栄養となる脂質を取り込むためと考えられ、モノクローナル抗体や抗癌剤のレシチン化の可能性が考えられる。さらに、SHR の動脈病変部への移行性の高さなど、IgG 単独とレシチン化 IgG の関係は、薬物単独と lipo 剤の関係と似ていて、当初予期したようにレシチン化 IgG は LM と IgG を結合させたと同様の組織分布を示した。生体内分布や細胞親和性の検討において、IgG 単独と IgG+アミノ化レシチンとはほとんど同じであり、レシチン化 IgG のみが有意な差を示すことは、レシチンの共存だけでなく、レシチンが IgG と共有結合している必要性を示唆する。

SOD に同様のレシチン化を行ったところ、SOD 活性が100%残存していたが、レシチンを活性蛋白に共有結合させることで、活性蛋白の活性がどうなるかはもっとも重要な問題であり、活性蛋白個々について細かく検討されねばならない。

今後の問題点としては、活性蛋白1分子に対していくつくらいのレシチンを導入すべきか、さらにここに示したように蛋白の -COOH に結合させるのがよいか、レシチンに -COOH を導入し蛋白の -NH₂ と結合させるのがよいか、さらにレシチンを導入した蛋白の抗原性はどうか変わるかなど、多くの問題点を残している。また、ここに述べた方法では、蛋白同士の重合体が生成するもの

避けられず、どうすれば蛋白同士の重合を防ぎうるかも課題となる。蛋白に結合させるレシチンも、より天然のものに近いものが副作用の軽減といった点からも望ましいのは当然であり、まだまだ多くの検討の余地を残している。

しかし、これらの点が解決されうれば、活性蛋白にレシチンを共有結合させることで、生体内動態をかえ細胞親和性を高めることが出来、今後、活性蛋白の臨床応用における有用性の高い DDS となりうると考えられる。

結 語

生物活性蛋白のレシチン化による DDS の検討のため、レシチン(phospholipid)の2位の側鎖にアミノ基を導入しカルボジイミド、あるいは塩化シアヌルを用いて、human IgG と結合させた。このレシチン化 IgG は、C₃H mouse 体内において臓器移行性、特に肝臓、腎臓、脾臓への移行率が高かった。また、preliminary な検討であるが、SHR の動脈病変部に高い移行性を示した。細胞親和性の検討において、ヒトリンパ球、MM 46 癌細胞、Sarcoma 180 癌細胞に高い親和性を示した。

つぎに、活性蛋白の一つとして、SOD に同様のレシチン化を行ったところ、SOD 活性の低下はみられなかった。

以上のように、活性蛋白にレシチンを共有結合させることで、これまで筆者らが検討してきた lipid microsphere (LM) とよく似た生体内分布、細胞親和性を示したことから、活性蛋白のレシチン化は、活性蛋白の効果的な DDS の一つとなりうると考えられた。

以上の研究において、SOD 活性測定や C₃H

mouse 体内分布などの実験にご協力戴いた武永美津子研究員に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 小河原 宏：バイオテクノロジーによる医薬品の開発。日薬会誌 41(2)：13～19, 1989.
- 2) Mizushima, Y., Shiokawa, Y., Homma, M., Kashiwazaki, S., Ichikawa, Y., Hashimoto, H., Sakuma, A. : A multicenter double blind controlled study of lipo-PGE₁, PGE₁ incorporated in lipid microsphere, in peripheral vascular disease secondary to connective tissue disorders. J. Rheuma. 14(1) : 97～101, 1987.
- 3) Mizushima, Y., Igarashi, R., Hoshi, K., Sim, A. K., Cleland, M. E., Hayashi, H., Goto, J. : Marked enhancement in antithrombotic activity of isocarboxycin following its incorporation into lipid microspheres. Prostaglandins 33(2) : 161～168, 1987.
- 4) Mizushima, Y., Hamano, T., Yokoyama, K. : Tissue distribution and anti-inflammatory activity of corticosteroids incorporated in lipid emulsion. Ann. Rheum. Dis. 41 : 263～267, 1982.
- 5) 五十嵐理慧：リボ-BRM の可能性。Pharma Medica 7(7) : 90～92, 1989.
- 6) Alan J. Schroit, John W. Madsen : Synthesis and Properties of Radioiodinated phospholipid Analogues that Spontaneously Undergo Vesicle-Vesicle and Vesicle-cell Transport. Biochemistry 22 : 3617～3623, 1983.
- 7) 泉屋信夫, 加藤哲夫：保護基の除去。ペプチド合成の基礎と実験。丸善出版 1985, p 164.
- 8) Karin G. Kjellen, Halina Y. Neujahr, : Immobilization of Phenol Hydroxylase. Biotechnology and Bioengineering II : 715～719, 1979.
- 9) Fielder, R. T., Bishop, C. T., Grappel, S. F., Blank, F. : An Immunogenic Polysaccharide-Protein Conjugate. J. Immunology 105(1) : 265～267, 1970.
- 10) Morris Kate (山川民夫, 斎藤国彦, 林 陽・訳) : 全リン量 Bartlett の改良マイクロ法。脂質研究法。東京化学同人, 1975, p 71.
- 11) Joe. M. McCord, Irwin Fridovich : Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. J. B. C. 244(22) : 6049～6055, 1969.