リポソームを用いた新たな標的化戦略と疾患治療への応用

清水 広介[†]

Development of New Liposome Targeting Strategies for Application of Disease Therapies

Kosuke Shimizu[†]*Department of Medical Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences,
University of Shizuoka; 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan.*

(Received September 8, 2016)

Drug delivery systems (DDS) are based on the concept of providing the optimal amount of a drug to a specific area requiring treatment. Liposomes are lipid-based nanoparticles capable of encapsulating any drug into both their membrane and aqueous phases. They have the potential to be targeted when their surfaces are modified with functional molecules such as antibodies and peptides. Thus, liposomes have strong potential as drug carriers if designed for active targeting. Our research group has recently developed a new concept for liposome targeting called “reverse targeting DDS (RT-DDS)”. RT-DDS differs from conventional active targeting in that the surface of the liposomes is modified with an antigenic molecule that is specifically recognized by antigen-specific immune cells. This review describes in detail the differences between these two DDS targeting concepts and proposes the application of RT-DDS to the treatment of allergies based on research using ovalbumin as a model allergy antigen.

Key words—allergy; drug delivery system; liposome; ovalbumin; reverse targeting; splenic B cell

1. はじめに

薬物送達システム (drug delivery system; DDS) は、疾患の治療を行うにあたり、生体に投与した薬物が最大限の薬効を示すための目的部位に、適当な量、そして適切な時間送達されるための技術の総称であり、新薬開発や原薬の安全性担保、機能拡張、ドラッグリポジショニングなどに向け注目を集める研究領域である。¹⁾ 中でも薬物キャリアを用いる方法は、汎用性や生産性などの点からよく利用されている。特に脂質二分子膜を基本構造として形成される閉鎖小胞のリポソームは歴史が古く、素材として生体成分を用いる点から安全性も担保されているため、DDS 創薬のために広く利用されている。リポソームは粒子径や表面電荷などの調整も容易であり、抗体、ペプチド、タンパク質、糖鎖といった機

能性分子の表面修飾も可能であることから、生体投与後の動態制御や分子間相互作用を利用した目的部位への標的化 (アクティブターゲティング、又は単にターゲティングとも言う) もできるため、薬物キャリアとしてのリポソームの適用は、主作用増強、副作用軽減を可能とするまさに薬物治療の理想に向けた創薬と言える。²⁾ 本稿では、リポソーム DDS を利用した新しい標的化の概念、“逆標的化”を中心に紹介するとともに、そのアレルギー疾患治療への応用について概説していきたい。

2. 標的化 DDS の概要 (標的化と逆標的化の違い)

一般的な標的化 DDS の概念は、標的となる部位 (例えばがん細胞) に多く発現する分子に対して特異性かつ高い親和性を有する機能性分子 (例えば抗体) を薬物キャリア表面に修飾することで、標的部位への送達効率の向上と非標的部位への集積回避を企てるものであり、薬物キャリアから標的部位へとという一方向性の能動的な送達を示す [Fig. 1(a)]。この標的化 DDS は様々な疾患に対して適用可能であり、特に広く研究されている疾患ががんである。周知の通り抗がん剤を用いるがん化学療法について

静岡県立大学薬学部医薬生命化学分野 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

現所属: [†]浜松医科大学光先端医学教育研究センター
フォトンクス医学研究部分子病態イメージング研究室
(〒431-3192 浜松市東区半田山 1-20-1)

e-mail: kshimizu@hama-med.ac.jp

本総説は、平成 27 年度日本薬学会東海支部学術奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Two Different Concepts between Conventional Active Targeting (a) and Reverse Targeting (b) DDS

は、一部のがん種に対しては明確な有効性を示すものの、多くのがんにおいてその効果が不透明な点があり、投与された抗がん剤の全身への非特異的分布と薬効の細胞非特異性により、患者の生活の質(QOL)を著しく低下する副作用の発現が社会的問題にまで発展している。よってがん治療における標的化 DDS 適用のニーズは非常に高い。実際に筆者も、がん細胞や腫瘍新生血管内皮細胞に多く発現する分子に親和性を有する抗体³⁾やペプチド、⁴⁾ レクチン⁵⁾を用いて、リポソームの固形がんへの効率的送達に成功しており、それに伴うがん治療効果の向上、つまり高い抗がん効果と原薬の副作用軽減効果を明らかとしている。⁶⁾

一方でわれわれの研究グループは数年前より、通常の標的化とは一線を画す新たな標的化概念を提唱してきた。それが逆標的化 (リバースターゲティング) DDS (RT-DDS) である。⁷⁾ その名の通り通常の標的化の逆、つまり逆方向の標的化ということである。前述の通り、通常の標的化は標的に対して薬物キャリアが積極的に結合することを示すが、逆標的化は、むしろ薬物キャリアが標的となり、薬物を送達したい対象となる細胞に認識してもらい薬物送達を行うものである [Fig. 1 (b)]。この標的化概念

の鍵となるのは、生体に備わる防御機構の免疫系である。詳しくは次項にて述べたい。

3. 逆標的化 DDS 戦略の概要

生体防御を担う免疫は、生命活動を維持していく中で必須であり、生体にとっての自己・非自己の区別は緻密に制御されている。例えばウイルスやバクテリア自体、またその感染細胞は、非自己つまり異物(抗原)として認識され排除される一方、生体を組織する正常な細胞は、自己として認識されることで免疫監視から逃れることができている。これに対し免疫系の異常、例えば非自己に対する過剰な炎症反応は、様々なアレルギー疾患やアナフィラキシーを発症し、また自己の非自己化は自己免疫疾患発症につながり、命を脅かすことも少なくないため、免

清水広介

浜松医科大学光先端医学教育研究センター・准教授、博士(薬学)。2003年静岡県立大学大学院薬学研究科博士前期課程修了。2005年同後期課程中退後、同大学薬学部・助手、助教、講師を経て、2016年10月より現職。2015年日本薬学会東海支部奨励賞、2016年日本 DDS 学会奨励賞受賞など。研究領域はリポソーム DDS。趣味はキャンプ等多数。

Fig. 2. Scheme of Therapeutic Strategy for Allergic Diseases Using RT-DDS

疫反応において異物に対する認識特異性はいかに重要となっているかがわかる。われわれはこの免疫を担う細胞群の抗原に対する緻密に制御された認識に着目し、その認識特異性を逆手に取って抗原を認識する免疫担当細胞群に薬物を効率よく送達する新たな DDS 技術として、逆標的化を提案した。この逆標的化を利用した疾患治療を考えた場合、その 1 つとしてアレルギー疾患治療への応用が挙げられる。通常、花粉症を代表とする即時型アレルギーは、抗原に初回暴露されて免疫が成立した生体に再度抗原に曝される際、その抗原に対して特異的な抗体（主として IgG 抗体）を表面に発現する脾臓内 B 細胞に認識され、形質細胞へと分化した後に抗原に対する特異的 IgE 抗体を分泌し、その IgE 抗体が鼻腔などの粘膜に存在する肥満細胞膜上に結合、そしてその抗体が抗原と相互作用した際に、ヒスタミンを含むケミカルメディエーターが分泌され、くしゃみなどの花粉症症状が引き起こされる。われわれの逆標的化戦略は、アレルギーの抗原となる分子（アレルゲン）をリポソーム表面に修飾したリポソーム（逆標的化リポソーム）を投与することで、リポソーム表面の抗原を介してリポソームを特異的に免疫担当細胞に認識させ、その際内封する薬物を細胞に送達することで、アレルギー発症に係わる免疫担当細胞

群を障害するものである。⁷⁾ 特に抗原特異的抗体の分泌を担う脾臓内 B 細胞を障害すれば、⁸⁾ アレルギー発症までの下流のカスケードにも影響を与えることができ、長期間花粉症の発症を抑えることができるであろうという仮説を立て、検討を行った (Fig. 2)。実際の研究結果については次項に述べる。

4. 逆標的化リポソームの調製と標的性評価

抗原を表面に付与した逆標的化リポソームを作製するにあたり、アレルギー疾患のモデル抗原として広く用いられている、オボアルブミン (ovalbumin; OVA) を選択した。リポソームは、生体への全身投与後目的の部位まで安定に内封薬物を送達できる、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を基本脂質組成とするものを用い、粒子径についてはエクストルーダーを用いて体内動態特性が良好な 130 nm 前後に調整した。また OVA のリポソームへの表面修飾は、タンパク質修飾によく用いられる *N*-スクシンイミドを反応基としてポリエチレングリコール (polyethylene glycol; PEG) 鎖の末端に有する脂質誘導体 (DSPE-PEG-NHS) を、リポソームと OVA とのリンカー分子として用い、DSPE-PEG-NHS に OVA を反応させた後、リポソームと混合することで行った。得られた OVA 修飾リポソームには、リポソーム 1 個あたり OVA が約 400

Fig. 3. Targeting Potential of OVA-modified Liposomes to Splenic B Cells in OVA-sensitized Mice

(a) Preparation of ovalbumin (OVA)-modified liposomes (OVA-lip). (b) Specific interaction of OVA-lip with anti-OVA antibody. Fluorescently labeled unmodified liposomes (Cont-lip) or OVA-lip were added to the wells coated with OVA-specific antibody, and the fluorescence intensity was measured. (c) Induction of OVA-specific IgG antibody production by OVA-lip injection to OVA-sensitized mice. OVA-sensitized mice were intravenously injected with 0.3 M glucose (vehicle), free OVA, or OVA-lip at days 8, 10, and 12 after OVA sensitization. At day 14, the amount of OVA-specific IgG antibody in the serum was measured by ELISA. (d) Co-localization of OVA-lip with splenic B cells. Fluorescently labeled Cont-lip or OVA-lip was intravenously injected to OVA-sensitized mice and the spleen sections were probed with Alexa488-conjugated anti-mouse IgG antibody for detecting B cells. The distribution of liposomes was observed under a confocal laser-scanning microscope. Arrows indicate the accumulation of liposomes.

分子結合していることが計算上求められており、抗原としてリポソームが認識されるためには十分であった [Fig. 3(a)]. 実際 OVA 修飾リポソームと OVA 特異的抗体との結合性を調べたところ、抗 OVA 抗体に対して OVA 修飾リポソームは効率よく結合した一方、コントロール抗体には結合を示さなかったため [Fig. 3(b)], 逆標的化リポソームの標的性は、リポソームに表面修飾された抗原とそれに対する特異的抗体との分子間相互作用によるものであることを明らかとした。また、この逆標的化リポソームが OVA としての抗原性を有しているかを調べるために、OVA で事前に感作したマウスに OVA 修飾リポソームを尾静脈内投与し、その後血中の抗 OVA 抗体価の測定を行ったところ、OVA 修飾リポソームの投与により、抗 OVA 抗体価が有意に上昇することを明らかとし、投与した OVA 修飾リポソームが抗原として認識され、抗原特異的抗体産生が誘導されることが示された [Fig. 3(c)].⁹⁾

さらに蛍光標識 OVA 修飾リポソームを OVA 感作マウスに尾静脈内投与し、その後の脾臓内におけるリポソームの分布の観察を行ったところ、OVA 未修飾リポソームでは脾臓内 B 細胞領域 (抗 IgG 抗体にて染色) の周辺に多く存在していたのに対し、OVA 修飾リポソームは、B 細胞領域と共局在することを明らかとした [Fig. 3(d)]. さらにアレルギー発症過程において特に重要であり、外来抗原に対する特異的抗体を産生する場として知られる胚中心にも局在することを明らかとした。⁷⁾ これらのことから、抗原を表面修飾する逆標的化リポソームは、抗原として免疫担当細胞に認識され、抗原特異的な抗体産生を担う B 細胞を標的化できることが示唆された。

5. 逆標的化を利用したアレルギー疾患治療

前項にて調製した逆標的化リポソームを、アレルギー疾患治療に適用するためには薬物の封入が必要となる。本戦略は長期的なアレルギー発症を抑える

Fig. 4. Anti-allergic Effect of FK506-encapsulated OVA-lip

OVA-sensitized mice were intravenously injected with 0.3 M sucrose (vehicle), FK506-encapsulated Cont-lip (LipFK), or FK506-encapsulated OVA-lip (OVA-LipFK, 5 μ g/kg/d as FK506 dosage) at days 14, 16, and 18 after the OVA sensitization. At day 21, OVA was intraperitoneally injected for boosting and the amounts of OVA-specific IgE (a) and IgG (b) antibodies in the serum were measured at day 28.

ことを目的とするため、抗原特異的な免疫担当細胞に直接的な障害を与える細胞障害性薬剤や免疫抑制剤が内封薬物として有効である。われわれは細胞障害性薬剤としてドキシソルピシン、免疫抑制剤としてFK506を選択し、OVA感作マウスに対する治療実験を行った。本稿ではFK506を用いた検討結果について紹介させて頂く。OVAの腹腔内投与によって感作したマウスに、FK506投与量として5 μ g/kg/dとなるように感作から14, 16, 18日後にOVA未修飾のFK506封入リポソーム (LipFK)、又はOVA修飾FK506封入リポソーム (OVA-LipFK)を尾静脈内投与した。その後21日目にOVAを追加免疫した際の血中抗OVA抗体価をELISAにて測定することにより、アレルギー治療効果を評価した。結果として、OVA-LipFKを処置することにより、OVA特異的IgE抗体並びにIgG抗体の産生が強く抑制されることを見出した (Fig. 4)。¹⁰⁾ 通常FK506を全身の免疫抑制を目的として使用する場合、1 mg/kg以上の投与が必要となるが、本標的化戦略ではごく微量の薬物投与量で、抗原特異的な免疫反応を抑制できることを明らかにした。なお、抗原修飾リポソーム投与によるアナフィラキシーの発症や、体重減少等の副作用はみられておらず、本治療法の安全性も示唆されている。これらの結果から逆標的化を利用したDDS戦略は、アレルギー疾患治療において有用であることが示めされた。

6. おわりに

本稿では新たな標的化概念、逆標的化DDSのA

レルギー疾患治療への応用について紹介させて頂いた。本稿ではOVAをモデル抗原として用いた成果を示させて頂いたが、現在スギ花粉の主要抗原であるCry j 1を用いた逆標的化リポソームを調製し、スギ花粉症治療への試みも行っており、実際に良好な結果を得ている。また、更なる適用拡大として、難治性の自己免疫疾患への応用にも挑戦し始めており、リポソームDDSを利用した新たな治療戦略の確立に向け、今後も多くのエビデンスを増やしていきたいと考えている。本研究成果が免疫疾患の新たな治療法として一石を投じるものとなれば幸いである。

謝辞 本研究を遂行するにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました静岡県立大学薬学部 奥 直人教授に心より感謝申し上げます。また本研究は、静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室にて実施され、浅井知浩准教授、小出裕之助教、木村純子特任助教からのご協力・ご助言、そして何よりも教室所属の学生、大学院生、卒業修了生が研究室にて手を動かして得た研究結果となります。この場をお借りして深謝申し上げます。また本研究は、科学研究費補助金を始めとする様々な助成金、また共同研究先からの多大なご支援により行われました。ここに御礼申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Allen T. M., Cullis P. R., *Science*, **303**, 1818–1822 (2004).
- 2) Allen T. M., Cullis P. R., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 36–48 (2013).
- 3) Nishikawa K., Asai T., Shigematsu H., Shimizu K., Kato H., Asano Y., Takashima S., Mekada E., Oku N., Minamino T., *J. Control. Release*, **160**, 274–280 (2012).
- 4) Sugiyama T., Asai T., Nedachi Y. M., Katanasaka Y., Shimizu K., Maeda N., Oku N., *PLoS One*, **8**, e67550 (2013).
- 5) Ikemoto K., Shimizu K., Ohashi K., Takeuchi Y., Shimizu M., Oku N., *Cancer Sci.*, **107**, 53–59 (2016).
- 6) Shimizu K., Asai T., Oku N., *Expert Opin. Ther. Targets*, **9**, 63–76 (2005).
- 7) Ichikawa K., Asai T., Shimizu K., Yonezawa S., Urakami T., Miyauchi H., Kawashima H., Ishida T., Kiwada H., Oku N., *J. Control. Release*, **167**, 284–289 (2013).
- 8) Cinamon G., Zachariah M. A., Lam O. M., Foss F. W. Jr., Cyster J. G., *Nat. Immunol.*, **9**, 54–62 (2008).
- 9) Ichikawa K., Urakami T., Yonezawa S., Miyauchi H., Shimizu K., Asai T., Oku N., *Int. J. Pharm.*, **336**, 391–395 (2007).
- 10) Shimizu K., Miyauchi H., Urakami T., Yamamura-Ichikawa K., Yonezawa S., Asai T., Oku N., *J. Drug Target.*, **24**, 890–895 (2016).