

粉症治療米の免疫活性についての検討. 第66回日本アレルギー学会学術大会, 東京, 6月.

- 3) 高石慎也, 斎藤三郎, 浅香大也, 光吉亮人, 杉本直基, 遠藤朝則, 鴻信義, 小島博己. スギ花粉症治療米の安全性の検討. 第36回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 下関, 2月.

医用エンジニアリング研究部

教授: 横山 昌幸 DDS, バイオマテリアル
准教授: 白石 貢一 DDS, バイオマテリアル,
イメージング

教育・研究概要

I. 急性期脳梗塞診断及び治療のための高分子キャリア開発

脳梗塞発症発症 4.5 時間以内の急性期において, 血栓溶解剤 (rt-PA) による血栓溶解療法が行われる。Rt-PA の主作用は血栓溶解であるが, 一方で, 血栓溶解後の副作用に症候性出血がある。Rt-PA による血栓溶解療法の有効性は示されているものの, rt-PA による血栓溶解療法によって短期間における出血率が高まることも示されている。Rt-PA による血栓溶解後に再灌流障害が起こり, その後に誘起される血液-脳関門 (BBB) の破綻によって出血が起こることはよく知られた事実である。再灌流障害時に rt-PA が脳実質に漏出し, 組織内に MMP-2, MMP-9 産生を誘起し, これらの誘導が出血につながると考えられている。これらの観点から, 脳梗塞の発症から血栓溶解治療を行う前までの短時間に脳出血の危険性を診断することが強く求められている。脳梗塞発症後の BBB の病態診断が出血の危険性とともペナンプラ等脳組織状態まで診断し, その後の治療効果にまで結びつくと考えられる。そのため, 医用エンジニアリング研究部は BBB の状態とその機能との関係をイメージング手法を用いて評価する研究を行っている。

これまで, 中大動脈虚血-再灌流ラットモデルにおける再灌流障害後の BBB の病態を, 研究部で作製した大きさ 20nm の高分子ミセル MRI 造影剤, 及び分子量の異なる高分子 MRI 造影剤によって分子サイズと BBB の透過性充進評価の関係を評価してきた。その中で, 分子量が最適な大きさに制御された高分子 MRI 造影剤は高分子ミセル MRI 造影剤とともに BBB 透過性充進状態を明瞭に画像化できることを報告してきており, 本 MRI 造影剤は有用性が高いことが示唆された。これらの結果から, 今後の発展に重要な点は作製した MRI 造影剤の安全性である。これまで一部の低分子 MRI 造影剤において, 腎機能が低下した患者へ投与された MRI 造影剤からガドリニウムイオンがキレート化合物から遊離し, 体内に蓄積することで重篤な副作用である腎性全身性線維症 (NSF) が引き起こされることが

報告されている。高分子 MRI 造影剤、または高分子ミセル MRI 造影剤は、一般に、低分子 MRI 造影剤と比較して半減期が長い。これによって、体内でガドリニウムイオンの漏出する機会が増えるため、より熱力学的安定数の高いキレート体を用いることが望まれる。そのため、作製した MRI 造影剤の安定性を低分子 MRI 造影剤と比較して評価し、安全性の担保とすることが求められる。

生体適合性高分子を基盤とする高分子 MRI 造影剤の安定性評価：低分子 MRI 造影剤において、腎機能低下患者への投与によって引き起こされる NSF は MRI 造影剤に含まれるガドリニウムイオンのキレート錯体からの漏出によって引き起こされる。生体中の半減期が低分子よりも長い高分子 MRI 造影剤の場合は、より高いガドリニウムイオン-キレート体の安定性が、安全面から求められる。血清成分存在下、キレート体から遊離するガドリニウムイオンの漏出を評価する液体クロマトグラフィを用いた実験系を確立している。単体のガドリニウムイオンは血清中のたんぱく質に何らかのイオン相互作用により配位することが分かった。一方、いくつかの低分子 MRI 造影剤を検討した中でガドリニウムイオンの遊離が速い低分子 MRI 造影剤があることが報告されており、これを検証した。今後、低分子 MRI 造影剤と高分子 MRI 造影剤の安定性を評価する系を確立し、高分子 MRI 造影剤の安定性を評価する。

II. 高分子ミセルキャリアシステムの免疫原性の解明

薬物キャリアの一つである高分子ミセルは 10~100nm の大きさを有し、内核と外殻という異なる性質をもつ 2 層構造を有している。内核層には治療薬から診断薬といった様々な薬物封入が可能であり、かつ外界と薬物との相互作用を親水性外殻によって守っており、これらの性質によって薬物動態を適切に制御できる。この薬物キャリアの特徴は親水性外殻の性質に依存するところが大きいですが、多くの場合、生体親和性に優れたポリエチレングリコール (PEG) が用いられている。PEG は生体親和性に優れ、無毒であることが知られており、多くの医薬品・食品等に用いられている。PEG は非常に低い抗原性を示し、10 種以上の PEG 化たんぱく質製剤が認可されている。しかしながら、PEG に対する免疫原性の問題が挙げられている。即ち、PEG 化たんぱく質製剤、PEG 化薬物キャリア投与において、抗 PEG 抗体産生が認められている。この抗 PEG 抗体

産生は、以降の治療に影響し、副作用が及ぶことが報告されている。一方で、医用エンジニアリング研究部は PEG の免疫原性の本質を捉えるために PEG 高分子の化学構造の観点から PEG 免疫原性を制御することを検討している。即ち、どのように PEG の免疫原性が付与されるかを明らかにすることで、PEG の免疫原性を低下させる手法への手がかりとなり、免疫原性低下のための有用な手法につながると考えられる。今年度は、抗体産生の最初のステップとなる抗原特異的な B 細胞表面受容体への結合を化学構造の観点から抑制させることを目指して検討を行った。即ち、PEG からなる合成高分子の化学構造の観点から PEG 特異的な B 細胞表面受容体への結合が抑制される分子設計を行い、新たな PEG 分子の免疫原性の低下を評価することを目的とした。

1. 合成高分子 PEG-P(Asp)-P(Phe) の合成

PEG に対する免疫原性制御を目的に、同じ PEG 鎖長、片末端を有する PEG 分子へ新たにポリアスパラギン酸 (P(Asp)) 鎖を導入した合成高分子の作製を試みた。PEG の末端アミノ基より任意の PBLA 鎖長を有するジブロック共重合体 PEG-PBLA を合成した。さらに、PEG-PBLA に対して、任意の割合でポリ (L-フェニルアラニン) を有するトリブロックコポリマー PEG-PBLA-P(Phe) を合成した。PEG-PBLA-P(Phe) の中間層となる PBLA ブロックをアルカリ溶液で加水分解し、3 種類の異なる P(Asp) 鎖長を有する目的の PEG-P(Asp)-P(Phe) トリブロックコポリマーを合成した。

2. 合成高分子 PEG-P(Asp)-P(Phe) の高分子ミセル作製

作製したトリブロックコポリマー PEG-P(Asp)-P(Phe) を用いて、ポリマー溶液を乾固した後に水溶液での超音波照射によって高分子ミセルを作製するエバポレーション法を用いて行った。作製した 3 種類の高分子ミセルの大きさは 60~110nm であった。

3. 新しい高分子ミセルの抗 PEG 抗体産生評価

合成高分子 PEG-PBLA ブロック共重合体、その類似高分子 PEG-P(Asp-Bzl) ブロック共重合体、及び PEG-リボソームは T 細胞非依存的に抗 PEG IgM 抗体を産生することが確認されている。既に、我々は PEG-PBLA を用いた抗 PEG IgM 抗体産生の検討において、抗 PEG IgM 抗体産生を最大値にするための最適投与量を求めている。即ち、この最大値をいかに抑制できるかを化学構造の観点から検

討した。新たに中間層の導入された高分子を設計し、作製した。3種類の間層鎖長を有する PEG-ポリマーからなる高分子ミセルを 0.001~1.0mg/kg の範囲内で投与し、その 1 週間後の血清に含まれる抗 PEG IgM 抗体を ELISA にて検出した。PEG-PBLA はポジティブコントロールとして、抗 PEG IgM 抗体産生を最大値にする 0.01mg/kg の投与量で投与した。

中間層鎖長の短い、中程度、長いという 3 種類の異なる高分子ミセルを投与した結果、中間層鎖長が最も短い高分子ミセル場合に、抗 PEG IgM 抗体産生は PEG-PBLA との比較において優位な差はなかった。一方、中間層鎖長が中程度、長い高分子ミセル場合に、抗 PEG IgM 抗体産生は PEG-PBLA との比較において優位に低かった。これらの結果は中間層に十分な長さが無い場合には結合抑制が達成されなかったが、中間層が長くなれば、それらの結合は抑制され、抗 PEG IgM 抗体産生が抑制されることが示唆された。

4. PEG-PBLA と免疫アジュバントとの複合投与における抗体産生応答の検証

PEG に対する免疫応答、即ち T 細胞非依存的な抗体産生は IgM を主とする応答であり、その PEG 高分子の化学構造、および投与量に応じて血中の抗 PEG IgM 抗体濃度、及び抗体が産生される持続期間が異なることを見出している。ここへ、免疫賦活剤（アジュバント）の作用によって、T 細胞非依存的な応答がどのような現象を示すのかを検討した。Toll 様受容体 4（TLR4）に対する作用を示す免疫アジュバントである LPS 誘導体を用いて検討を行った。免疫アジュバントは水への溶解性が低いため、免疫原性の低い PEG 分子に可溶化させ、抗原として免疫原性の高い PEG-PBLA と投与を行った。免疫原性の低い PEG 分子へアジュバントを可溶化させた場合、PEG-PBLA の免疫原性に変化は見られなかった。

その一方で、アジュバントを免疫原性の高い PEG-PBLA に可溶化させて投与を行った（PEG-PBLA/Adj）。PEG-PBLA/Adj の系は PEG-PBLA 単独の場合の抗体産生応答とは異なる応答を示した。即ち、アジュバント作用によって抗 PEG IgM 抗体産生の応答が低下することを見出した。アジュバントが免疫原性の高い PEG-PBLA と同じミセル内に存在することで、アジュバント作用が PEG-PBLA の免疫応答を変化させたと考えられるが、今後、より詳細な検討を行う予定である。

「点検・評価」

2017 年度より医用エンジニアリング研究部は柏・臨床医学研究所内へと異動し、新たに研究部の立ち上げを行った。薬物ターゲティングにおいて学内外との共同研究を引き続き進めており、本年度は論文発表にまで至った。研究部の新たな出発とともに研究に成果を上げ、次年度以降の論文につながっていくと思われる。教育面においては、学生に対して新たな医療技術となりうる研究を体験して頂けるよう、研究部として受け入れ態勢を整えていきたいと考えている。

1. 急性期脳梗塞診断及び治療のための高分子キャリア開発

脳梗塞発症発症 4.5 時間以内の急性期における虚血-再灌流障害時の BBB 血管透過性は rt-PA 治療以降に誘導される出血と深く関わっている。そのため、虚血-再灌流障害における BBB 透過性の評価は非常に重要な手法と考えられている。これまで本学地下動物実験施設にある高磁場 MRI を用いた虚血-再灌流ラットモデルにおいて、新たな MRI 造影剤作製に基づき脳組織内の特異的環境場の画像化を達成していた。この研究は本学総合医科学研究センター内超音波応用開発研究部との共同で行った研究であり、今後も共同研究を進め、治療に活かす技術まで進めたいと考えている。一方で、この高分子を基盤とする新たな MRI 造影剤の検討課題は生体中の半減期が長いことによる安全面の担保である。治療薬に比べて、より高い安全性が求められる診断薬において、その安全性は十分に検討すべき課題であり、昨年度より MRI 造影剤の安定性評価試験を開始した。現在、検出条件の最適化検討を行っている段階ではあるが、一部の低分子 MRI 造影剤とその他の高分子 MRI 造影剤を含む MRI 造影剤において、ガドリニウムイオン-キレート体の安定性が異なる結果が得られ始めている。定量的な遊離ガドリニウムイオンの評価に基づき、安定性試験を確立し、新しい高分子 MRI 造影剤の定量的安定性試験に基づく安全性基準を評価していく予定である。高分子を基盤とする MRI 造影剤においては、他大学との共同研究でリンパ造影においても効果を示すことを報告した。さらなる研究の展開が期待されるとともに、安全性の担保という観点に基づき、定量的な安全性評価を行っていくことが強く求められる。

2. 高分子ミセルキャリアシステムの免疫原性の解明

医用エンジニアリング研究部では薬物キャリアシステムで用いられる PEG に対する抗 PEG 抗体産生

とその影響について世界に先駆けて初めて明らかにしてきた。開発中の PEG 化製剤を含め、多くのたんぱく質製剤が認可、及び臨床試験中にある。その中で PEG に対する免疫原性への関心はアカデミア、及び企業において高まっている。そのため、PEG に対する免疫原性の本質を明らかにすることはアカデミアに求められる重要な事項であると考えられる。今年度は科学研究費による新たなテーマとして、これまでの免疫学には当てはまらない概念を導入し、免疫原性抑制をテーマに研究を開始した。新たな分子設計を行い、その合成に成功した。新たな合成高分子の免疫原性を評価したところ、化学構造の違いに基づく抗体産生抑制に効果が得られた。詳細な検討が引き続き必要であるが、ここで得られた結果は重要な結果を含んでおり、抗原とその免疫原性制御という観点において新たな化学的手法として期待が持たれる。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Shiraishi K, Yusa S¹⁾, Ito M¹⁾, Nakai K¹⁾ (¹ Univ Hyogo), Yokoyama M. Photo irradiation-induced core crosslinked poly (ethylene glycol)-*block*-poly (aspartic acid) micelles: optimization of block copolymer synthesis and characterization of core crosslinked micelles. *Polymers* 2017; 9(12): 710.
- 2) Akai H¹⁾, Shiraishi K, Yokoyama M, Yasaka K¹⁾, Nojima M¹⁾, Inoue Y (Kitasato Univ), Abe O¹⁾, Ohmoto K (Int Univ Health Welfare), Kiryu S¹⁾ (¹ Univ Tokyo). PEG-poly (L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agent: feasibility study of a Gd-micelle contrast agent for MR lymphography. *J Magn Reson Imaging* 2018; 47(1): 238-45.
- 3) Asakura T, Yokoyama M, Shiraishi K, Aoki K, Ohkawa K. Chemotherapeutic effect of CD147 antibody-labeled micelles encapsulating doxorubicin conjugate targeting CD147-expressing carcinoma cells. *Anti-cancer Res* 2018; 38(3): 1311-6.

II. 総説

- 1) 横山昌幸. 第1章: ナノ DDS・リポソーム DDS の医薬品応用 1 節: 高分子ミセルの DDS キャリアとしての有用性と製剤化. 情報技術協会企画編集. DDS 先端技術の製剤への応用開発. 東京: 情報技術協会, 2017. p.3-14.
- 2) 白石貢一. 第6章: 病変部位・臓器をターゲットとした DDS の具体的な応用事例 1 節: 脳梗塞における DDS. 情報技術協会企画編集. DDS 先端技術の製剤

への応用開発. 東京: 情報技術協会, 2017. p.323-30.

- 3) 王 作軍, 横山昌幸, 中田典夫, 澤口能一. 超音波およびマイクロバブル併用の in vitro における血栓溶解増強効果の定量的評価. *超音波テクノ* 2017; 9-10 月号: 72-7.

III. 学会発表

- 1) Shiraishi K, Wang Z, Yokoyama M. Hyper-permeable blood-brain barrier (BBB) is a key of theranostic and diagnostic approaches for neurological diseases. International Symposium of Polymer Therapeutics Focusing the EPR effect and its Future Development. Kumamoto, Apr.
- 2) 白石貢一, 王 作軍, 青木伊知男 (放射線医学総合研究所), 横山昌幸. 脳虚血-再灌流モデルにおける ADC と BBB 透過性の関係. 第12回日本分子イメージング学会総会・学術集会, 横浜, 5月.
- 3) Shiraishi K, Kawano K¹⁾, Maitani Y¹⁾ (¹ Hoshi Univ), Mochizuki S²⁾, Sakurai K²⁾ (² Kitakyushu Univ), Aoshi T³⁾⁴⁾, Ishii KJ³⁾⁴⁾ (³ Osaka Univ, ⁴ Natl Inst Biomedical Innovation), Yokoyama M. Elucidation of PEG's immunogenicity. 第66回高分子学会年次大会. 千葉, 5月.
- 4) 白石貢一, 川野久美¹⁾, 米谷芳枝¹⁾ (¹ 星薬科大), 青枝大貴²⁾³⁾, 石井 健²⁾³⁾ (² 大阪大, ³ 医薬基盤研究所) 横山昌幸. PEG 特異的抗体産生応答からみる結合アフィニティと抗体クラスの関係. 第33回日本 DDS 学会学術集会. 京都, 7月.
- 5) 白石貢一, 王 作軍, 青木伊知男 (放射線医学総合研究所), 横山昌幸. Blood-brain barrier (BBB) の透過性充進評価と脳神経疾患との関連. 第33回日本 DDS 学会学術集会. 京都, 7月.
- 6) 横山昌幸, 白石貢一. (シンポジウム3: ナノ材料と分析化学) 高分子ミセル製剤のキャラクタリゼーション. 第30回バイオメディカル分析科学シンポジウム. 東京, 8月.
- 7) 横山昌幸. DDS と分子イメージング研究における医学と工学のギャップ. 第17回中国四国地区高分子材料研究. 高知, 10月.
- 8) 白石貢一, 川野久美¹⁾, 米谷芳枝¹⁾ (¹ 星薬科大), 青枝大貴²⁾³⁾, 石井 健²⁾³⁾ (² 大阪大, ³ 医薬基盤研究所), 横山昌幸. PEG 特異的抗体産生応答からみる結合アフィニティと抗体クラスの関係. 第39回日本バイオマテリアル学会大会. 東京, 11月.
- 9) 白石貢一, 横山昌幸. PEG の免疫原性. 第68回医用高分子研究会. 東京, 3月.