

## 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. 生体適合性高分子を基盤とする高分子 MRI 造影剤と安定性評価

昨年度まで、医用エンジニアリング研究部は疾患の血管状態に依存した特異的な画像検出を行うことを目的に、MRI を用いたイメージング手法のための MRI 造影剤開発を行っている。現在、既存の MRI 造影剤は低分子ガドリニウムイオン( $Gd^{3+}$ )-キレート錯体が用いられており、非特異的な MRI 造影剤の血中への拡散に伴う造影効果を示す。低分子 Gd-キレート錯体を MRI 造影剤として用いた場合に、大きな問題は低分子 Gd-キレート錯体のもつ短い半減期、それに伴う多量の造影剤投与が必要になること、及び繰り返し投与による生体内中への蓄積と蓄積に伴う障害である。特に、MRI 造影剤の主排出経路である腎排出機能に機能低下がみられる患者に対しては、重篤な腎性全身性線維症 (NSF) が引き起こされる。この NSF は MRI 造影剤の蓄積によって Gd イオンのキレート錯体からの漏出が起きていると考えられている。一方、MRI 造影剤の可能性という点においては、組織、疾患特異的な MRI 造影剤によって病態特異的な造影が可能になれば、その診断における有効性は大きく広がる。医用エンジニアリング研究部では、分子の大きさに依存した病態診断が可能になる MRI 造影剤の開発を行ってきており、いくつかの実験モデルにおいて画像検出に成功している。今後の発展に重要な点は作製した MRI 造影剤の機能を保ちながら、安全性を担保することである。これまでの本研究部で開発した MRI 造影剤は造影効果が十分に発揮されることを明らかにしたが、一方で、Gd-キレート錯体としての安定性を下げている。そこで、新たに安定性の維持、及び造影効果の維持という安全面と機能面を担保できる MRI 造影剤の開発を進めた。さらに、血清成分存在下、MRI 造影剤の安定性評価に必要な条件を見出し、液体クロマトグラフィを用いた実験系を確立した。

#### 1. 生体適合性高分子を基盤とする高分子 MRI 造影剤の作製

これまで生体適合性高分子であるポリグルタミン

酸を基盤とする MRI 造影剤開発を行い、P(Glu-ED-DOTA-Gd) を作製した。ここで用いたキレート化剤は 7 配位分子であった。一方、より安定な Gd-キレート作製を形成させた MRI 造影剤開発のために、新たに 8 配位型キレート化剤 (DOTAGA) の導入を検討した。高分子 MRI 造影剤の合成は P(Glu-ED-DOTA-Gd) と同様であるが、保護基のついた DOTAGA (tBu) の導入と脱保護により P(Glu-ED-DOTAGA-Gd) を作製した。8 配位型 MRI 造影剤 P(Glu-ED-DOTAGA-Gd) は Gd イオンの 9 つの配位場のうち 8 つをキレート化剤で覆われているため、その造影効果は 7 配位型 MRI 造影剤 P(Glu-ED-DOTA-Gd) と比較してわずかに低い値を示した。

#### 2. MRI 造影剤の安定性評価

50%血清成分存在下における、MRI 造影剤の安定性評価として、Gd 錯体から遊離される Gd イオンの検出を行った。低分子 MRI 造影剤として Gd-DTPA, Gd-DTPA-BMA, 及び作製していた高分子 MRI 造影剤として P(Glu-ED-DOTA-Gd) を用いて比較した。21 日までの評価において、それぞれに差はなかった。一方、Gd イオンの蓄積の原因は生体中のリン酸イオンと Gd イオンとの塩形成が原因であると考えられている。そこで、リン酸イオン存在下において、遊離 Gd イオン検出を行うと、リン酸イオン存在下において Gd イオンの遊離は加速され、安定性に差が現れた。高分子 MRI 造影剤 P(Glu-ED-DOTA-Gd)、新たに作製した P(Glu-ED-DOTAGA-Gd) は安定な低分子 MRI 造影剤として知られる Gd-DOTA と同様の安定性を示した。この検討を行った中で高分子ミセル型 MRI 造影剤は最も高い安定性を示した。作製している高分子 MRI 造影剤は低分子に比べれば十分に分子量が大きく、生体内に存在する時間が延長される。即ち、低分子と比べて、Gd イオンの遊離する機会が増えることを意味する。そのため、造影効果の維持と安全性の担保を求めるために、高分子ミセル MRI 造影剤における最も安定性、安全性が高く、かつ造影効果の高い MRI 造影剤の作製に着手している。

#### II. 高分子ミセルキャリアシステムを用いた免疫原性の解明

薬物キャリアの一つである高分子ミセルは 10~100nm の大きさを有しており、高分子ミセル内部への薬物封入は薬物動態を適切に制御する。薬物キャリアの動態は、薬物キャリアの親水性保護膜に依存する。一般に、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。現在、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 投与時に起こる免疫原性の問題が挙げられている。即ち、PEG 化たんぱく質製剤において、抗 PEG 抗体産生が認められている。さらには、非PEGたんぱく質製剤投与群においても、抗 PEG 抗体が観測されることが報告されている。薬物キャリアにおいても、強い毒性を有する抗腫瘍製剤封入した場合を除き、抗 PEG 抗体が観察されている。

一方で、本研究部は PEG の免疫原性の本質は PEG だけにあるのではないことを報告しており、PEG と用いる高分子、たんぱく質の性質の観点から PEG 免疫原性を制御することを検討している。昨年度、抗体産生の最初のステップとなる抗原特異的な B 細胞表面受容体と PEG 分子との結合を化学構造の観点から抑制させ、薬物キャリアの抗 PEG 抗体の抑制を目指して検討を行った。一方、本手法は、薬物キャリアの抗 PEG 抗体の産生を抑制させるばかりではなく、PEG 分子全般に適用可能な手法として検討を行った。

#### 1. インターフェアリング効果による抗 PEG 抗体産生抑制の評価

新たに合成した PEG ポリマー (1) の抗 PEG 抗体抑制原因について、(1) と抗 PEG 抗体との結合を阻害するインターフェアリング効果を明らかにするために、抗 PEG 抗体が (1) を再度、結合できる状態にさせることを行った。即ち、抗 PEG 抗体への結合をインターフェアする分子鎖に対して、その分子鎖の効果を中和することを行った。その結果、再度、抗 PEG 抗体が (1) へ結合することが確認された。

#### 2. 抗 PEG のための分子設計の新展開

PEG に対する免疫原性抑制手法を薬物キャリアに展開したが、さらに、その手法を発展させることを目的に新たな PEG 化たんぱく分子の合成に着手した。一方、比較のため既存の PEG 分子を用いて PEG 化たんぱく質を合成した。現在、いくつかの合成経路からの手法を検討し、最適な経路を見出している。

#### 3. PEG-PBLA と免疫アジュバントとの複合投与に伴う免疫アジュバントの影響

昨年度、PEG に対する T 細胞非依存的な IgM 産生に対して、Toll 様受容体 4 (TLR4) に対する作用を示す免疫賦活剤 (アジュバント) である LPS 誘導体を共作用させると、非常に興味深いことに

PEG に対する IgM 産生応答を変えることを見出していた。アジュバントと PEG による作用が同時に働くことによって、PEG 分子の免疫応答を変化させたと考えられる。一方、アジュバントの親化合物であり、高い炎症性応答を示す LPS は投与量依存的に TLR4 のダウンレギュレーションを引き起こし、その応答を抑制することが知られている。即ち、PEG に関連した応答の中に TLR4 に依存している応答が関係していることが示唆される。今後、より詳細な検討を行う予定である。

#### 「点検・評価」

2018 年度は柏・臨床医学研究所内へと異動してから 2 年目となり、研究遂行がスムーズに行えるようになった。一方で、発表論文数が減ってしまった点は、課題としてあげられる。本研究部の研究成果を論文として発表できるように、次年度以降は研究とともに成果発表にも力をいれていく必要がある。教育面においては、医学部 3 年の研究室配属生に対して、医学とは異なる視点として工学的な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、研究室配属に 2 名の学生を受け入れた。次年度以降も継続して、学生を受け入れ体制を整えていきたい。

#### 1. 生体適合性高分子を基盤とする高分子 MRI 造影剤と安定性評価

高分子を基盤とする新たな MRI 造影剤に着手した。この高分子を基盤とする新たな MRI 造影剤に対する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。MRI 造影剤の安定性評価法を確立し、検討を行った結果、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、Gd-錯体の安定性が異なる結果が得られた。定量的な遊離 Gd イオンの評価法は新しい高分子 MRI 造影剤の定量的安定性試験に重要な検討課題であるため、引き続き検討を進める。

#### 2. 高分子ミセルキャリアシステムを用いた免疫原性の解明

医用エンジニアリング研究部は生体適合性 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。PEG 化たんぱく質製剤が認可され、PEG 化たんぱく質製剤の研究開発、及び臨床試験が進められる中で 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。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。今年度は新たな国際

共同研究を進める科学研究費がスタートし、これまでの免疫学には当てはまらない概念を用いた研究テーマを開始した。ここで得られるであろう結果は、1 つには PEG 化製剤開発への重要な指針となるばかりでなく、他方には薬物キャリアに展開することで遺伝子デリバリー等にも応用可能になる。一方、抗原と免疫応答という観点においての重要性は、PEG 分子だけに留まらず、その他の分子設計に展開することが可能になると期待される。

## 研究業績

### II. 総説

- 1) Shiraishi K, Yokoyama M. Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review. *Sci Technol Adv Mater* 2019; 20(1): 324-36.

### III. 学会発表

- 1) 白石貢一, 王 作軍, 青木伊知男 (放送医学総合研究所), 横山昌幸. (ポスター) 脳虚血再灌流モデルにおける血液脳関門透過性亢進 MRI 評価. 第 71 回日本酸化ストレス学会. 京都, 5 月.
- 2) 白石貢一, 川野久美<sup>1)</sup>, 米谷芳枝<sup>1)</sup>(<sup>1</sup> 星薬科大), 青枝大貴<sup>2)3)</sup>, 石井 健<sup>2)3)</sup>(<sup>2</sup> 大阪大, <sup>3</sup> 医薬基盤・健康・栄養研究所), 横山昌幸. (ポスター) Polyethylene glycol に対する免疫原性の抑制法の検討. 第 13 回日本分子イメージング学会総会・学術集会. 東京, 5 月.
- 3) 白石貢一, 王 作軍, 青木伊知男 (放送医学総合研究所), 横山昌幸. (シンポジウム 3: 疾患環境の理解と DDS) MRI による疾患情報の可視化と DDS への展開. 第 34 回日本 DDS 学会学術集会. 長崎, 6 月.
- 4) 白石貢一, 横山昌幸. (ポスター) 高分子の化学構造に基づく anti-PEG IgM 抗体産生評価. 第 34 回日本 DDS 学会学術集会. 長崎, 6 月.
- 5) Shiraishi K, Yokoyama M. (Poster) Evaluation of hydrophobic conjugate-dependent PEG-related antibody responses. 2018 CRS (Controlled Release Society) Annual Meeting and Exposition. New York, July.
- 6) Shiraishi K, Yokoyama M. (Poster) Facts of PEG's immunogenicity and perspective views for future PEGylation. 18th Symposium for Gene・Design and Delivery. Kitakyushu, July.
- 7) 白石貢一. (シンポジウム 5: 次世代 MRI とがん研究: 基礎から臨床へ) ナノ MRI 造影剤のチャンス・セラノスティクスへの展開. 第 46 回日本磁気共鳴医学会大会. 金沢, 9 月.

### IV. 著書

- 1) Yokoyama M, Shiraishi K. Chapter 5: Clinical Diagnostic Imaging. In: Ito Y (RIKEN), ed. *Photochemistry for Biomedical Applications: From Device Fabrication to Diagnosis and Therapy*. Singapore: Springer Singapore, 2018. p.107-30.