

Title	高分子担体を用いた固定化細胞の機能評価と細胞療法等への応用に関する研究
Author(s)	岡田, 直貴
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3128984">https://doi.org/10.11501/3128984</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	岡田直貴
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第13083号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	高分子担体を用いた固定化細胞の機能評価と細胞療法等への応用に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範  (副査) 教授 馬場 明道 教授 前田 正知 教授 溝口 正

#### 論文内容の要旨

生命体がホメオスタシスを維持する機構の中で驚嘆すべきことは、細胞が様々な制御のもとで、如何にタイミング良くホルモンやサイトカインをはじめとする生理活性物質を生合成し、細胞外に徐放しているかである。細胞に本来に備わった生理活性物質の生合成機能・センサー機能・徐放機能等の制御機構は、生理活性物質を薬物に見立てた場合、薬物治療の最適化を目指すDDS (drug delivery system: 薬物送達システム) を具現化したものであり、機能性・合理性という面から眺めると細胞に勝る製剤はないといっても過言ではない。現在行われている薬物療法は、細胞間のネットワーク・ホメオスタシスを無視した治療法であるため、どうしても生体に負の作用をも及ぼすことになる。一方、細胞を介して疾病の治療を行う、いわば細胞療法 (cell therapy) ともいべき新しい概念による薬物治療は、生体内においてDDS の概念を日常的に実践している細胞の機能を最大限に利用したものであり、この治療法に適用する剤形は、いわば「細胞性製剤 (cytomedicine)」とも呼ぶべきものと言えよう。さらに、近年の遺伝子工学および細胞工学の格段の進歩に伴い、種々の機能を付与した機能性細胞の創製も可能となってきており、今後、様々な疾病に対して細胞性製剤を用いた薬物治療の応用が期待される。

しかしながら、医薬品として有用な生理活性物質を合成・分泌する機能性細胞を、生体に直接投与して疾病治療を行おうとした場合、細胞をどのように製剤化するかが問題となり、生体内において高い安全性と安定性を保持した剤形に仕上げる必要がある。生命体は生物学的な自己を識別する特別なシステムとして免疫系を高度に進化させ、生体防御の中心的システムとしているため、同種異系 (allogeneic) あるいは異種 (xenogeneic) の機能性細胞を生体に直接投与しようとする、忽ちホストの免疫系により投与した細胞は拒絶され、短期間でその機能を失うことは必至である。また、たとえ細胞性製剤に用いる機能性細胞が同種同系 (isogeneic) である場合においてさえ、何らかの修飾が施されたことによる抗原性発現の可能性は否めない。さらに、ホストと遺伝学的および免疫学的に近縁な cell line の細胞を利用した場合には腫瘍原性も大きな問題となる。即ち、細胞性製剤を安定に機能させるためには、まず生体防御機構として欠くことの出来ない免疫系に影響を与えることなく、生体内で非自己の機能性細胞を長期間生存させるという矛盾した問題を解決しなければならず、その上で安全性をも考慮に入れた粒子設計が要求される。

そこで著者は、半透性の高分子物質を用いて機能性細胞を包括固定化し、物理的バリアーにより機能性細胞を免疫系から隔離することで、生体内で長期間生理活性物質を分泌する細胞性製剤の開発が可能になると考えた。細胞性製剤の開発に用いる高分子担体は、封入細胞の生存・増殖に不可欠な酸素や栄養物を自由に透過し、比較的高分子量

の免疫系エフェクター分子である抗体や補体の透過および免疫担当細胞の侵入を阻止することが望ましい。さらに、封入細胞の産生・分泌する生理活性物質を生体へ作用させるためには、当然ながら高分子担体からの生理活性物質の放出が為されなければならない。しかしながら、薬物となる生理活性物質の分子サイズは細胞性製剤を適用する疾病に応じて様々であり、また高分子担体に封入して生体に投与する細胞とそれを投与されるホストとの遺伝学的あるいは免疫学的背景の組合せにより要求される免疫隔離性も異なることから、高分子担体の物質透過性は制御可能であることが必要とされる。また高分子担体には、至適な物質透過性を保持しつつ、生体内へ投与する操作中および生体内に存在する間の機械的・物理的外力に対して耐え得るだけの強度が必要とされる。さらに、細胞性製剤が生体内で長期間安定に機能するには、高分子担体が生物学的に安定であり、且つ宿主細胞の接着やタンパク質吸着等の修飾を受けない優れた生体適合性を有していることも必要である。本研究では、細胞性製剤の粒子設計に用いる高分子担体としてアガロースマイクロビーズおよびアルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルを選択し、まず、それぞれの高分子担体の特性に関して検討すると共に、調製条件の最適化を行った。アガロースマイクロビーズは生体適合性に関して、APA マイクロカプセルは強度に関してそれぞれ改善点は残すものの、両高分子担体とも細胞性製剤開発に応用するために備えるべき条件を比較的満足していることが判明した。また、カプセル強度に主眼をおいたAPA マイクロカプセルの改良として、その調製段階でポリ(L)リジンおよびアルギン酸による処理を2回ずつ行う方法を提示し、従来よりも強度に優れたAPA マイクロカプセルの調製に成功した。これらの検討結果をもとに、最も研究目的に合致した特性を有するアガロースマイクロビーズあるいはAPA マイクロカプセルを選択し、固定化細胞を用いた新規*in vivo* 腫瘍誘導血管新生評価系を確立、さらには細胞性製剤の開発とその有効性に関して検討を行った。

血管新生は、組織の代謝を維持し生体の機能的恒常性を保持するために不可欠であり、血管内皮細胞の重要な生物学的特性の一つである。しかし、癌の増殖・転移成立過程においても血管新生は普遍的に認められる現象であり、この腫瘍誘導血管新生は悪性腫瘍への栄養や酸素等の供給に不可欠であることから、治療とも結びつく非常に重要な現象である。癌病巣における血管新生の重要性は速くから指摘されていたが、簡便で正確なアッセイ法が無い等の理由によりその研究は癌の他の分野に比べて著しく遅れており、癌治療を目的とした血管新生抑制物質の探索をするために、簡便且つ定量性に優れた新規*in vivo* 腫瘍誘導血管新生測定系の開発が急務となっている。

マウスの体内においてヒト癌細胞をはじめとする異種癌細胞が誘導する血管新生を再現するには、移植癌細胞をマウスの免疫系から回避させつつ、移植癌細胞の産生・分泌する血管新生促進因子を周囲組織に作用させなければならない。アガロースマイクロビーズに封入した癌細胞をマウスの皮下に投与したところ、免疫学的バリアーを越えて血管新生を誘導・形成させることが可能であり、新たに確立したmouse hemoglobin enzyme - linked immunosorbent assay (mHb - ELISA) によって定量したmHb 量をもって、相対的に*in vivo* 血管新生量を評価できることが明らかとなった。また、本系で誘導された新生血管はアガロースマイクロビーズ内の癌細胞から分泌された液性因子の影響を強く受けており、正常組織あるいは炎症組織の血管とは異なる腫瘍血管様の特性を保持していることが判明した。さらに、既に血管新生抑制活性が報告されている物質を用いた検討により、本系が血管新生抑制物質スクリーニング系としての機能を十分に備えていることも示された。以上の結果は、腫瘍誘導血管新生の新規*in vivo* 評価系の開発に成功したことを示すと共に、高分子担体に封入した非自己の細胞を生体に投与することで、局所的ではあるが封入細胞の産生する生理活性物質をデリバリーすることが可能であることを示している。

そこで次に、「固定化細胞が分泌する生理活性物質を全身性に作用させ疾病治療に応用する」という戦略に基づいた細胞療法という視点から、細胞性製剤の開発の可能性に関して検討を行った。抗ヒトインターロイキン-6モノクローナル抗体 (SK 2 mAb) を分泌するSK 2細胞を封入したアガロースマイクロビーズ (Aga - SK 2細胞) あるいはAPA マイクロカプセル (APA - SK 2細胞) をモデルに、細胞性製剤の機能および有効性を評価した。培養系での検討により、Aga - SK 2細胞およびAPA - SK 2細胞はSK 2 mAb の徐放化担体として十分な機能を有しており、担体内部に封入されたSK 2細胞は極めて良好な細胞形態を保持していることが判明した。そこで、加齢に伴いIgG 1プラズマサイトーシスおよびメサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎を発症し、SK 2 mAb の長期頻回投与によってそれらの病態改善が認められるヒトインターロイキン-6トランスジェニックマウス (hIL - 6 Tgm) に、Aga - SK 2細胞あるいはAPA - SK 2細胞を単回腹腔内投与し、その治療効果を評価した。Aga - SK 2細胞

あるいはAPA-SK 2細胞を投与したhIL-6 Tgmでは、無処置群と比較してIgG 1プラズマサイトーシスおよびメサングウム細胞増殖性糸球体腎炎の明らかな発症抑制とそれらに伴う顕著な延命効果が認められた。高分子担体に封入していないfree SK 2細胞を投与したhIL-6 Tgmには殆ど治療効果が無かったことから、高分子担体が内部に封入したSK 2細胞をホストの免疫系から保護し、長期間に渡るSK 2 mAb 産生・分泌を達成させたことが強く示唆された。ホスト体内におけるAPA-SK 2細胞の機能に関して詳細な検討を行ったところ、APA-SK 2細胞はallogeneicなマウス腹腔内において良好な増殖とSK 2 mAb 分泌を示し、APA-SK 2細胞を投与したマウスの血中には投与後80日間に渡ってSK 2 mAb が検出された。これらの結果は、細胞性製剤が生理性物質の長期 *in vivo* デリバリーに非常に有効であることを示している。

細胞性製剤とホストとの関係がallogeneicあるいはxenogeneicな場合において、細胞性製剤による治療の最も大きな障害がホスト免疫系の活性化に伴う拒絶反応である。即ち、細胞性製剤の投与によるホスト免疫系の活性化を阻害し、細胞性製剤の治療有効期間を延長させるためには、高分子担体による封入細胞のホスト免疫系からの完全な隔離が望まれる。そこで、細胞性製剤投与に対するホストの免疫応答をAPA-SK 2細胞をモデルとして検討したところ、APA-SK 2細胞投与によりallogeneicなホストの細胞性免疫系は影響を受けないものの、SK 2細胞が分泌する可溶性のアロ抗原あるいは腫瘍関連抗原の刺激によると考えられる液性免疫系の活性化と、それに伴うSK 2細胞に対する特異抗体の産生が促されることが判明した。また、APAマイクロカプセルがallogeneicなホストの特異的な免疫反応から封入細胞を保護することは可能であるが、xenogeneicなホストの液性免疫系から封入細胞を完全に保護することはできないことも明らかとなった。今後、細胞性製剤の免疫学的な検討が更に進展する必要があると共に、封入細胞の液性免疫系からの完全な隔離を目指した新規高分子担体の開発が望まれ、補体等の生体防御因子を失活させる機能を有したポリマー成分の応用が期待される。

以上本研究において、高分子担体に封入した機能性細胞を生体内に投与することにより、生理活性物質の長期 *in vivo* デリバリーが達成されることを明らかとし、新規DDS製剤としての細胞性製剤の概念および方法論を提示した。

## 論文審査の結果の要旨

生命現象の中で、細胞は様々な制御の連関の下で必要なときに、必要な量の生理活性物質を、必要な部位で合成・分泌し、生命体の恒常性の維持をはかっている。細胞に本来的に備わった生理活性物質の生合成機能、センサー機能、徐放機能などの制御機構は、生理活性物質を薬物に見立てた場合、薬物治療の最適化を目指すDDS (Drug Delivery System: 薬物送達システム) を具現化したものであり、機能性・合理性からみた場合細胞に勝る製剤はないと言って過言ではない。従って、この方法による剤形は「細胞性製剤」とも呼ぶべきものであろう。近年の遺伝子工学の進歩により、細胞に特定遺伝子を導入する技術の開発が進み、種々の機能を付与した機能性細胞の作製が可能となってきている。この機能性細胞を利用した細胞性製剤が次世代のDDS製剤として実現ができれば、例えば、糖尿病患者に適用した細胞性製剤は「血中グルコース濃度の上昇を自らのセンサー機能によって認識し、その濃度に応じてインスリンを放出し、一方で、グルコース濃度の低下に従ってインスリンの放出を停止する」と言った、高度知的製剤として、その機能を生体内でいかに発揮してくれるであろう。このような細胞性製剤の出現は、薬物治療の世界に革命をもたらすに違いない。

しかしながら、これらを実現する為には、1) 細胞を傷つけることなく、如何に細胞内に生理活性物質の遺伝子などを導入し、細胞にDDS製剤的機能を付与するか、2) 如何に細胞機能を損なわずに高分子担体に包括固定するか、3) 包括固定化した機能性細胞を如何に生体内で長時間安定に機能させるか、等の問題を解決しなければならない。1) に関しては、著者らの研究室で膜融合リポソームというベクター開発が既になされ、良好なデータが得られつつある。従って、著者は上記2), 3) について検討し、機能性細胞を生体内で安定に長時間機能させるための細胞性製剤の粒子設計を行った。

その結果、以下の結論が得られた。

1) アルギン酸-ポリ(L)リジン-アルギン酸 (APA) マイクロカプセルはポリ(L)リジンの分子量および反応回

数を選択することで、強度・粒子径などの特性を制御することが可能であり、生体内安定性・生体適合性に優れた高分子担体であることを認めた。

2) APA マイクロカプセルに封入した抗ヒトIL-6モノクローナル抗体産生細胞 (APA-SK2細胞) は良好な増殖を示し、抗ヒトIL-6モノクローナル抗体 (SK2抗体) をカプセル外へ長期間放出することが判明した。

3) APA-SK2細胞を腹腔内に投与することで、ヒトIL-6トランスジェニックマウスのIgG1プラズマサイトーシスおよびメサンギウム細胞増殖性糸球体腎炎の症状軽減と生存日数の顕著な延長が達成された。

4) APA-SK2細胞は、アロジェニックな宿主免疫系による障害から保護されており、APA-SK2細胞を投与したマウスの血中には、SK2抗体が投与後80日間にわたって検出された。

以上のように、高分子担体に封入した機能性細胞を生体に投与する事により、生理活性物質の長期in vivo デリバリーが達成されることを明らかにし、新規DDS製剤としての細胞性製剤の概念および方法論を提示している点、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものである。