

メトトレキサート複合ポリ-L-リジンを内包した血小板の作製とその機能評価

*¹関西大学大学院理工学研究科, *²大阪医科薬科大学内科学IV教室リウマチ膠原病内科,

*³関西大学先端科学技術推進機構 (ORDIST)

大原 貴志*¹, 横井 里奈*¹, 北井 はる香*¹, 小谷 卓也*², 鈴鹿 隆保*², 武内 徹*², 柿木 佐知朗*^{1,3}
Takashi OHARA, Rina YOKOI, Haruka KITAI, Takuya KOTANI, Takayasu SUZUKA, Tohru TAKEUCHI, Sachiro KAKINOKI

1. 目的・方法

関節リウマチ (RA) は全身の関節に慢性炎症が生じる自己免疫疾患で、本邦における患者数は80万人にも上ると推定されている。メトトレキサート (MTX) は、1999年の承認以降、2011年に高用量投薬が、2022年に皮下注射製剤がそれぞれ承認され、現在では関節リウマチ治療の第一選択薬として利用されている。しかし、MTXの全身分布に起因する消化器障害、肝機能障害、骨髄障害や間質性肺炎 (MTX肺炎) などの合併症が依然として課題となっている。骨髄中の巨核球から産生される無核の血小板は、炎症部位に集積して活性化されると、多様な増殖因子を含む顆粒を放出するなど、炎症の制御に強く関与している¹⁾。本研究では、血小板をMTX輸送担体とした新しい関節リウマチ治療法の開発を目的とし、生体膜透過性と水溶性を兼ね備えたMTXとポリ-L-リジン (PLL) との複合体の合成とその血小板との相互作用の解析に取り組んだ。

MTXとフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識PLL (PLL-F) を、アミド化反応で連結することで、MTX修飾PLL-F (PLL-F-MTX) を合成した。得られたPLL-F-MTXを限外ろ過 (分画分子量: 3000 Da) で精製し、¹H-NMR (プロトン核磁気共鳴) で構造を解析した。マウス血小板をリン酸緩衝液 (PBS) で懸濁してPLL-F-MTX溶液を添加後 (血小板濃度: 1.0×10^7 platelets/25 μ L, PLL-F-MTXの平均残基濃度: 10 mmol/L), 37°Cで1時間ゆるやかに転倒混和し、血小板を遠心分離で回収して共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに、血小板へのPLL-F-MTX内包量と血小板にADP (adenosine diphosphate) 刺激を与えた際のPLL-F-MTX放出量を蛍光分光法で定量した。

2. 結果

¹H-NMRスペクトルでリジン残基の α 水素、FITCのキサ

■ 著者連絡先

関西大学大学院理工学研究科
 (〒564-8680 大阪府吹田市山手町3-3-35)
 E-mail. sachiro@kansai-u.ac.jp

ンテン環水素、MTXのメチル基水素に由来する各プロトンが検出されたことから、PLL-F-MTXが合成されたことを確認した。リジン残基側鎖アミノ基のFITCおよびMTX置換率は、それぞれ約1.8%および約1.1%であった。MTXの超純水に対する溶解度は0.2 mmol/Lと報告されている²⁾が、MTX濃度で5 mmol/LのPLL-MTXが超純水に完溶した。つまり、MTXはPLLとの複合化により超純水中における溶解度が25倍以上向上した。さらに、PLL-F-MTX溶液に懸濁した血小板内にFITC由来の蛍光が観測されたことから、血小板内へのPLL-F-MTXの導入が示唆された。血小板に内包されたPLL-F-MTX量は0.39 nmol/ 10^7 plateletsであり、ADP刺激をした際のPLL-F-MTX放出量は未刺激と比較して1.4倍程度増加した。すなわち、PLL-F-MTX内包血小板がADP刺激による活性化に伴う顆粒放出能を保持していることが示唆された。

3. まとめ・独創性

MTXとPLLとの複合体の合成と、それを用いて血小板内に高濃度のMTXを導入することに成功した。さらに、同複合体を内包した血小板がADP刺激による活性化能を保持していることも明らかとした。

血小板を薬物輸送担体として利用したRA治療法は、国内外において報告例がない。今後は、同複体内包血小板の機能や関節炎治療効果を検証し、血小板をMTX運搬体として活用した新しい関節炎治療法の確立を目指す。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Golebiewska EM, Poole AW: Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev* **29**: 153-62, 2015
- 2) Moshikur RM, Chowdhury MR, Wakabayashi R, et al: Ionic liquids with methotrexate moieties as a potential anticancer prodrug: Synthesis, characterization and solubility evaluation. *J Mol Liq* **278**: 226-33, 2019