

氏名	にし かわ まき や 西 川 元 也
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 561 号
学位授与の日付	平 成 8 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	糖修飾を利用した細胞選択的薬物ターゲティングシステムの開発に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 橋 田 充 教 授 中 川 照 眞 教 授 川 寄 敏 祐
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

生体内における特異的認識現象を薬物体内動態の制御に利用する薬物ターゲティングは、作用発現点に特異性がない薬物の有用性を高める方法として有望である。肝細胞表面に存在するアジアロ糖タンパク質レセプターをはじめとする糖鎖認識機構は、特定の細胞に発現した厳密な基質認識性を有することから、細胞選択的ターゲティングへの利用が期待されており、これまでも糖タンパク質あるいは糖修飾高分子をキャリアーとした薬物ターゲティングが活発に試みられてきた。しかしながら、合理的なキャリアーの設計に必要な糖修飾高分子の物理化学的、生物学的特性と全身投与後の体内動態特性との関連に関する速度論的情報は乏しいのが現状である。そこで著者は、先ず牛血清アルブミン (BSA) の糖修飾体を用い、糖修飾高分子の基本的な体内動態特性を薬動的解析を通じて明らかにした後、得られた情報に基づき高分子キャリアーシステムを開発した。また、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) を用い、タンパク質医薬品に対しても糖認識によるターゲティングが治療効果改善に有効であることを示した。さらに、種々のガラクトース修飾タンパク質の体内挙動特性を速度論的に解析し、糖修飾タンパク質医薬品の分子設計に関する指針を得た。

I. 糖修飾 BSA 誘導体を用いた糖修飾高分子の体内動態特性の解明

モデル高分子として BSA を選択し、ガラクトース、マンノース、グルコース修飾体 (Gal-BSA, Man-BSA, Glc-BSA) を合成した。分布動態解析に適した ^{111}In 標識体を用いて各修飾体の体内動態を検討した結果、Gal-BSA は肝臓の血漿流速とほぼ等しい速さで主に肝臓の実質細胞に取り込まれ、一方 Man-BSA は肝臓の非実質細胞と脾臓への回収が多く、導入した糖を認識するレセプターの分布と一致することが示された。また、Michaelis-Menten 型の肝臓取り込み過程を組み込んだ生理学的速度論モデルを用いて解析することにより、糖修飾 BSA ならびにデキストランの非線形肝臓取り込み過程を定量的に評価できることも示された。

II. 肝臓指向性キャリアーの開発とそれを利用した薬物ターゲティング

水溶性が高く化学修飾可能な反応基を多く有し、またタンパク質と比べ抗原性が低いなどの利点を有するデキストランをキャリアー骨格として選択し、応用性の広い細胞選択的キャリアーシステムの開発を試みた。前章においてデキストランが低投与量条件下に肝実質細胞に取り込まれることが明らかとなったことから、これを防ぐためカルボキシメチル基を導入してキャリアー骨格とし、さらにガラクトースおよびマンノースを導入した修飾体を合成した。両糖修飾体は、それぞれ肝実質細胞、非実質細胞に対して極めて高い特異性を有するキャリアーであることが示され、抗癌剤シタラピンに対し肝臓特異的ターゲティングが実現された。さらに、デキストランと比較して生体内で速やかに分解されるポリ-L-グルタミン酸 (PLGA) を用いた肝細胞選択的キャリアー (Gal-PLGA) を合成し、ビタミン K₅ の肝細胞へのターゲティングにより血液凝固能が回復することを確認した。

III. 糖修飾による SOD の肝臓ターゲティングと虚血・再灌流障害に対する治療効果改善

活性酸素除去酵素である SOD に対し、ガラクトースおよびマンノース修飾を施し、肝臓へ選択的にターゲティング可能な誘導体を合成した。肝臓への血流を一定時間遮断後再灌流することにより肝臓障害モデルを作成し、胆汁中への色素排泄を指標に SOD 誘導体の障害抑制能を評価した結果、SOD およびその高分子修飾体投与群と比較して糖修飾 SOD 投与群では胆汁排泄能の回復が認められ、タンパク質医薬品に対しても糖修飾によるターゲティングが有効であることが示された。

IV. 体内動態の速度論的解析に基づく糖修飾タンパク質の分子設計

臨床応用が期待されているタンパク質医薬品の多くは、分子量が比較的小さく速やかに糸球体濾過される。糖修飾高分子の標的部位への送達効率、標的細胞による取り込み速度と標的以外への分布あるいは消失速度とのバランスによって決定されることから、ターゲティング効率の高い糖修飾タンパク質を設計するためには、各移行過程の速度と糖修飾タンパク質の物理化学的特性との関係を明らかにする必要がある。そこで、モデルタンパク質として BSA (分子量67,000)、SOD (分子量32,000) に加え、牛免疫グロブリン (IgG:分子量150,000)、大豆トリプシンインヒビター (STI:分子量20,000)、卵白リゾチーム (LZM:分子量14,000) を選択し、各ガラクトース修飾体の体内動態特性を検討した。いずれの場合もガラクトース修飾により肝臓への移行増大が認められたが、STI および LZM 誘導体では投与量の30~40%しか肝臓へ送達できず、これに対して分子サイズの大きいタンパク質では肝臓移行量が80%に達し、またガラクトース残基数を増加させると肝臓へのターゲティング効率が上昇することも明らかとなった。さらに、糖修飾タンパク質の構造と肝臓ターゲティング効率との関係を第 I 章で構築した薬動学モデルを用いて解析した結果、タンパク質分子表面のガラクトース残基密度がガラクトース修飾タンパク質の肝臓取り込み過程の親和性を決定していることが示唆された。

以上、著者は糖修飾高分子の体内動態特性を糖修飾 BSA を例に用いて整理し、次に糖修飾高分子の体内動態解析に有用な生理学的薬動学モデルを構築した。また、デキストランおよび PLGA を骨格とする

細胞選択的キャリアーシステムを開発し、薬物ターゲティングへの適用に成功した。さらに、SODを糖修飾により肝臓へターゲティングすることで治療効果が改善されることを示し、タンパク質医薬品の肝臓指向型誘導体化に関する設計指針を得た。これらの知見は、細胞選択的薬物ターゲティングシステムの開発に有益な設計指針を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

肝細胞表面に存在するアシアロ糖タンパク質レセプターをはじめとする糖鎖認識機構は、特定の細胞に発現した厳密な基質認識性を有することから、細胞選択的薬物ターゲティングへの利用が期待されているが、糖修飾高分子の物理化学的、生物学的特性と全身投与後の体内動態特性との関連に関する速度論的情報は少なく、ターゲティングシステムに対する合理的な設計指針は得られていない。著者は、糖修飾高分子の基本的な体内動態特性を薬動的解析を通じて明らかにした後、得られた情報に基づき高分子キャリアーシステムを開発した。また、タンパク質医薬品に対しても糖認識によるターゲティングが治療効果改善に有効であることを示し、さらに種々のガラクトース修飾タンパク質の体内挙動特性を速度論的に解析して、糖修飾タンパク質医薬品の分子設計に関する指針を得た。まず、牛血清アルブミンの各種糖修飾体を合成し、分布動態解析に適した¹¹¹In標識体を用いて各修飾体の体内動態を検討した結果、導入した糖を認識するレセプターの分布に従い、ガラクトース修飾体は肝臓の血漿流速とほぼ等しい速さで主に肝臓の実質細胞に、一方マンノース修飾体は肝臓の非実質細胞と脾臓に取り込まれることを確認した。また、Michaelis-Menten型の肝臓取り込み過程を組み込んだ生理学的速度論モデルに基づき、各糖修飾体の非線形肝臓取り込み現象を定量的に評価できることを示した。次に、水溶性が高くまた抗原性が低いなどの利点を有するデキストラン、あるいは生体内で速やかに分解されるポリ-L-グルタミン酸を用いた異なる機能性を有するキャリアーシステムの開発を試み、それぞれの糖修飾体が抗癌剤シタラビンやビタミンK₅を細胞特異的に肝臓に送達させることを確認した。さらに活性酸素除去酵素スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)に同様の修飾を施し、その肝臓移行動態および肝虚血再灌流障害に対する効果を検討した結果、SODおよびその高分子結合体と比較して糖修飾体が優れた障害抑制効果を持つことを確認し、糖修飾がタンパク質医薬品の細胞ターゲティングにも極めて有効であることを見いだした。最後に、ターゲティング効率の高い糖修飾高分子の設計指針を得ることを目的として、分子量および修飾率が大きく異なるタンパク質のガラクトース修飾体を合成し、肝臓ターゲティング効率との関係を薬動学モデルを用いて解析した結果、タンパク質分子表面のガラクトース残基密度がガラクトース修飾タンパク質の肝臓取り込み過程の効率を決定していることを確認し、修飾率に対する指針を得た。

以上、著者は糖修飾高分子の体内動態特性を整理し、次に糖修飾高分子の体内動態解析に有用な生理学的薬動学モデルを構築した。また、細胞選択的キャリアーシステムを開発し、薬物ターゲティングへの適用に成功した。さらに、タンパク質医薬品の肝臓指向型誘導体化に関する設計指針を得た。これらの知見は、細胞選択的薬物ターゲティングシステムの開発に有益な情報を提供するものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成8年10月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。