

氏名	たかぎ あきら 高木 彰
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第739号
学位授与の日付	平成19年9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	遺伝子組み換えヒト型インターロイキン-11の体内動態特性とその制御方法に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 橋田 充 教授 高倉喜信 教授 掛谷秀昭

論文内容の要旨

インターロイキン11 (IL-11) はマカクザルの骨髓繊維芽細胞株のcDNAより最初にクローニングされた液性因子であり、単独あるいは他の液性因子との協働によって巨核球の増殖・成熟促進作用を示す。遺伝子組み換え技術により大腸菌で発現させたヒト型IL-11であるrhIL11は、癌化学療法又は放射線治療に伴う血小板減少症の治療薬として期待されているが、治療を効率的に行うためには、投与方法あるいは薬物送達法の確立が不可欠であり、その基礎となる体内動態の特性と分子機構の解明および得られた知見に基づく合理的な動態制御の方法論の開発が極めて重要である。著者は、rhIL11の基本的な体内動態を解析し、薬理効果との関連性に基づいて、より治療効果の高い誘導体、投与形態の開発を行った。

(I) rhIL11の全身投与後の体内動態評価

rhIL11を¹¹¹Inで放射標識し、その体内動態、特に投与後初期における臓器取り込み過程の解析を行った。放射標識rhIL11は静脈内投与後速やかに血中及び標的臓器である骨髓から消失し、ELISAおよび生物活性を指標とした測定結果との比較により、投与後初期の血中濃度や臓器取り込みの推移が未変化体rhIL11の体内挙動を反映していることを確認した。また、速やかな消失には糸球体濾過が主要な役割を果たし、肝クリアランスの寄与も大きいことが明らかになった。

(II) rhIL11の体内動態支配因子に関する検討

腎灌流実験系を用い、filtering及びnon-filtering条件下での灌流実験を行うことにより、rhIL11の腎取り込み過程を定量的に分離評価した結果、rhIL11の腎臓での消失に糸球体濾過後の近位尿細管における高効率な再吸収及び血管側からの取り込みの両者のプロセスが関与し、さらにこれらの取り込みに飽和過程が存在することが明らかとなった。次に、rhIL11の肝臓内動態をラット定速注入肝灌流実験系を用いて検討した結果、注入濃度の上昇とともに肝抽出率及び肝クリアランスは減少し、飽和のある取り込み過程の関与が示唆されたが、アフィニティーは低くまた最大取り込み速度も小さかった。rhIL11の肝実質細胞及び非実質細胞への分布比は各細胞の血漿との接触面積とよい一致を示したことから、肝での取り込みは肝構成細胞との非特異的な吸着に基づくものであると考えられた。さらに、3種のカチオン性タンパク質を用いrhIL11との同時投与による全身動態並びに腎内動態への影響について検討した結果、腎、肝での消失プロセスに高いカチオン性を有するrhIL11と組織との静電的相互作用が関与することが明らかとなった。

(III) ポリエチレングリコール修飾rhIL11の血中動態並びに薬理効果に関する検討

rhIL11の全身循環からの早い消失の克服を目指して分子サイズの増大及び高いカチオン性の被覆による体内動態の改善を試みた。rhIL11の血中滞留性は分枝型のPEG修飾により未修飾rhIL11の約50-60倍と劇的に長くなり、高分子修飾が有効であった。一方、rhIL11の生物活性はPEG修飾により減弱したが、in vivo投与においてrhIL11の薬理効果である血小板増多作用は著しく増強され、単回投与でもrhIL11の3日間持続皮下投与と同等であった。

(IV) ヒアルロン酸を用いたrhIL11の徐放性製剤の設計と薬理効果に関する検討

rhIL11の血小板増多効果が巨核球の分化誘導の初期から後期に亘る過程の亢進によることから、徐放性製剤化が薬理効

果の増大に有用と考え、最適な血中濃度の持続期間を設定するために先ず総投与量を固定し投与継続時間を変化させて薬理効果を検討した結果、血中濃度の持続時間を3日間とすると血小板数は劇的に増加した。この際定常状態の血中濃度は約2 ng/mlであったことから、この値以上にrhIL11の血中濃度を長時間維持することのできる持続製剤の開発を試みた。rhIL11がそのアミノ酸配列中に多くのカチオン性アミノ酸を含むことから、アニオン性高分子としてヒアルロン酸を含む製剤を調製し、皮下投与後の血中濃度の持続と薬理効果について検討した。本製剤を投与した際の血小板数の推移は、rhIL11を1～2日間持続注入した場合に類似し、効果はrhIL11血中濃度の持続時間に対応していた。一般にヒアルロン酸マトリクスを用いた薬物の徐放化にはヒアルロン酸の高粘性及び薬物との静電的な相互作用が関与するものと考えられるが、本製剤における徐放効果はbFGFやEPOの場合よりも顕著に高く、蛋白質の3次元構造解析の結果、rhIL11の放出持続化には粘度や電荷のみでなく、rhIL11中の特異的な配列(BX₇B)とヒアルロン酸との相互作用も関与する可能性が示唆された。

以上、rhIL11の体内動態特性を解析し、得られた知見を基に、高分子修飾並びに徐放製剤化による治療効果の増強を試みた。rhIL11の体内からの早い消失にはその分子サイズと分子全体としての高いカチオン性が関与することが明らかとなり、PEGなどを用いた高分子修飾により血中濃度の持続化が達成され血小板増多作用の増強も認められた。一方、rhIL11と静電的及び配列特異的に相互作用するヒアルロン酸を用いた徐放性製剤によっても血中濃度を持続させ薬理効果を向上させることに成功した。

以上の結果はrhIL11の投与方法の確立あるいはより一般的にサイトカイン類に対する効果的な薬物送達法の開発において有益な指針を提供するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ヒト型インターロイキン11 (rhIL11) は巨核球の増殖・成熟促進作用を示し、癌化学療法又は放射線治療に伴う血小板減少症の治療薬として期待されている。申請者は、rhIL11の基本的な体内動態を解析し、薬理効果との関連性に基づいてより治療効果の高い誘導体、投与形態の開発を行った。

最初に、動態解析を目的として、rhIL11を¹¹¹Inで放射標識し投与後初期における臓器取り込み過程の解析を行った結果、放射標識rhIL11は静脈内投与後速やかに血中及び標的臓器である骨髄から消失し、ELISAおよび生物活性を指標とした測定結果との比較により、投与後初期の血中濃度や臓器取り込みの放射活性の推移が未変化体rhIL11の体内挙動を反映していることを確認した。また、速やかな消失には糸球体濾過が主要な役割を果たし、肝クリアランスの寄与も大きいことが明らかになった。次に腎灌流実験系を用い、rhIL11の腎取り込み過程を定量的に分離評価した結果、rhIL11の腎臓での消失に糸球体濾過後の近位尿細管における高効率な再吸収及び血管側からの取り込みの両者のプロセスが関与し、さらにこれらの取り込みに飽和過程が存在することを明らかにした。一方、rhIL11の肝臓内動態をラット定速注入肝灌流実験系を用いて検討した結果、飽和のある取り込み過程の関与が示唆されたがアフィニティーは低くまた最大取り込み速度も小さかった。また、rhIL11の肝実質細胞及び非実質細胞への分布比は各細胞の血漿との接触面積とよい一致を示したことから、肝での取り込みは肝構成細胞との非特異的な吸着に基づくものであると考えられた。さらに、3種のカチオン性タンパク質を用いrhIL11との同時投与による全身動態並びに腎内動態への影響について検討した結果、腎、肝での消失プロセスに高いカチオン性を有するrhIL11と組織との静電的相互作用が関与していることを明らかにした。

以上を基盤に、rhIL11の全身循環からの早い消失の克服を目指して分子サイズの増大及び高いカチオン性の被覆による体内動態の改善を試みた結果、rhIL11の生物活性はPEG修飾により減弱したが、血中滞留性は分枝型のPEG修飾を行うと未修飾rhIL11の約50-60倍となり、またin vivo投与においてrhIL11の薬理効果である血小板増多作用は著しく増強されて単回投与でも3日間持続皮下投与と同等であった。さらにIL11の血小板増多効果が巨核球の分化誘導の初期から後期に亘る過程の亢進によることより徐放性製剤化が薬理効果の増大に有用と考え、最適血中濃度の持続期間を検討した結果、定常状態の血中濃度は約2 ng/mlで血中濃度の持続時間を3日間としたとき血小板数は劇的に増加し、血中濃度をこの値に長時間維持することのできる持続製剤の設計を行った。rhIL11がそのアミノ酸配列中に多くのカチオン性アミノ酸を含むことに着目して、アニオン性高分子としてヒアルロン酸を含む製剤を調製し、皮下投与後の血中濃度の持続と薬理効果について

検討した結果、血中濃度の持続時間に対応して血小板数増加効果が認められた。一般に、ヒアルロン酸マトリクスを用いた製剤における徐放化では、ヒアルロン酸の高粘性及び薬物との静電的な相互作用の寄与が期待されるが、本製剤における徐放効果はbFGFやEPOの場合よりも顕著に高く、蛋白質の3次元構造解析の結果、ヒアルロン酸製剤によるrhIL11の放出持続化にrhIL11中の特異的な配列（BX₇B）とヒアルロン酸との相互作用も関与している可能性が示唆された。

以上、本研究ではrhIL11の体内動態特性を解析し、得られた知見を基に、高分子修飾並びに徐放製剤化による治療効果の増強とコンプライアンスの向上を試みて、PEG等を用いた高分子修飾、あるいはrhIL11と静電気的及び配列特異的に相互作用するヒアルロン酸を用いた徐放性製剤化修飾によって、血中濃度の持続化とそれに伴う血小板増多作用の増強を得た。以上の結果は、rhIL11の投与方法の確立あるいはより一般的にサイトカイン類に対する効果的な薬物送達法の開発において、有益な指針を提供するものと考えられる。

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19年8月29日論文内容とそれと関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。