学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)

学位記番号 薬 博 第 583 号

学位授与の日付 平成17年9月26日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科·専攻 薬学研究科医療薬科学専攻

学位論文題目 Site-specific Delivery of Catalase by Cationization for Prevention of

Reactive Oxygen Species-Mediated Tissue Injury

(活性酸素組織障害の抑制を目的としたカチオン化によるカタラーゼの部位

特異的デリバリーに関する研究)

(主 査)

論文調查委員 教授橋田 充 教授高倉喜信 教授佐治英郎

論文内容の要旨

近年のヒトゲノム解析および遺伝子工学の進展に伴い,多種多様な生理活性タンパク質の機能解析が進み,その医薬品としての開発が検討されている。カタラーゼ(CAT)は過酸化水素を分解する酵素であり,活性酸素障害が問題となる炎症性疾患の治療などへの応用が期待されている。しかしながら,CATによる治療効果を最大限に引き出すには,ドラッグデリバリーシステム(DDS)の概念に基づいた標的部位への特異的デリバリーが必要である。タンパク質を対象とした DDS技術の一つであるカチオン化は,静電的相互作用により負に帯電した細胞表面にタンパク質を結合させる有効な方法である。これまでにカチオン化タンパク質に関する検討が種々行われてきたが,カチオン化タンパク質医薬品の合理的分子設計に必要とされる分子構造一物性一体内動態に関する相関は明らかではない。そこで本研究では,ウシ血清アルブミン(BSA)をモデルタンパク質として選択し,合成したカチオン化誘導体の物理化学的性質と体内動態特性との関係を明らかにすることを試みた。そして得られた相関に基づいてカチオン化 CAT を開発し,その体内動態特性を検討するとともに肝臓及び腎臓における活性酸素障害に対する抑制効果を評価した。

I. カチオン化 BSA の正電荷依存的肝臓移行動態の解析

BSA のカルボキシル基にヘキサメチレンジアミン(HMD)あるいはエチレンジアミン(ED)を結合することでカチオン化 BSA(HMD-BSA,ED-BSA)を得た。遠紫外及び近紫外領域における円二色性(CD)スペクトルと蛍光スペクトルから、いずれの場合にも修飾率の増大に伴う二次及び三次構造変化の増大が示された。また、カチオン化による自由アミノ基増加数と毛細管電気泳動度との間には良好な直線関係が得られた。マウスに静脈内投与したところ、カチオン化 BSAは投与量の大部分が肝臓へ集積した。同程度の修飾率の誘導体で比較した場合には HMD-BSA がより速やかに肝臓に集積したことから、長い側鎖を有するジアミン化合物によるカチオン化が肝臓デリバリーには有効であることが示唆された。速度論的解析の結果、カチオン化 BSA の肝臓取り込みクリアランスは電気泳動度と良好に相関し、電気泳動度が肝臓デリバリーのためのカチオン化の指標になることが示された。また、修飾率の増大により分子構造が変化したのに対し、肝臓取り込みクリアランスは上限が認められたことから、カチオン化によるタンパク質肝臓デリバリーには至適カチオン化レベルが存在することが示された。

Ⅱ. 四塩化炭素誘発性急性肝障害抑制を目的としたカチオン化カタラーゼの開発

第1章の結果に基づき、CAT にカチオン化修飾を施すことにより HMD-CAT、ED-CAT を合成した。いずれの誘導体においてもカチオン化に伴う二次構造変化が若干認められ、また ED 修飾により高修飾率でありながら高い残存酵素活性を有する誘導体が得られた。ヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いた検討において、カチオン化 CAT は高い細胞結合性を示した。HepG2 に過酸化水素を添加することで惹起される細胞毒性は、カチオン化 CAT の前処置により有意に抑制された。次にマウス静脈内投与後の体内動態を評価したところ、BSA の場合同様速やかな肝臓への集積が認められた。そこで四塩化炭素をマウス腹腔内に投与することで活性酸素が関与する急性肝障害モデルマウスを作成し、この障害モデルでのカチオン化

CAT の障害抑制効果を評価した。四塩化炭素により血清中 GOT, GPT, LDH 濃度が大きく上昇し、肝臓 GSH 含量にも減少が認められたが、カチオン化 CAT, 特に ED-CAT により肝障害が有意に抑制された。以上、本研究で開発した ED-CAT は、活性酸素が関与する急性肝障害抑制に有効であることが示された。

Ⅲ. カチオン化カタラーゼによるシスプラチン腎毒性の軽減と抗腫瘍効果の増強

シスプラチンは種々の固形癌に対する有効性が認められているが、腎臓をはじめ複数の臓器に対する重篤な副作用が臨床上問題とされる。この副作用発現には活性酸素が関与することから、前章で開発した ED-CAT によるシスプラチン腎毒性の軽減について検討した。シスプラチンを腹腔内に単回あるいは繰り返し投与することで腎障害モデルマウスを作成し、CAT 誘導体の静脈内投与による抑制効果を評価した。シスプラチン 20mg/kg の単回投与により血清中 BUN 及びクレアチニン濃度が著しく増加し、5日目にはマウスは全例死亡した。この重篤なシスプラチン毒性は ED-CAT により顕著に抑制され、血清中 BUN、クレアチニン、LDH、NO 増加に対する抑制効果が得られるとともに、腎臓内 GSH 含量の減少と過酸化脂質の生成も抑制された。このことから、ED-CAT を併用することでシスプラチンの投与量を増大できる可能性が示された。そこで、マウスメラノーマ細胞株 B16-BL6/Luc を皮下移植することで作成した担癌マウスを用い、シスプラチン投与による抗腫瘍効果を検討した。その結果、シスプラチン単独では急性毒性によりマウスは短期間で死亡したが、ED-CAT 併用群ではシスプラチン毒性が有意に抑制され、腫瘍増殖抑制効果も得られた。以上の結果より、ED-CAT はシスプラチン腎障害を抑制可能であり、その併用によりシスプラチン毒性を軽減した抗癌治療が実現可能であることが示唆された。

以上本研究では、まずカチオン化 BSA の物理化学的性質と体内動態特性との相関について系統的な検討を行うことで部位特異的デリバリーを達成するためのタンパク質医薬品の製剤設計に関する新たな指針を得た。そして本手法を CAT に適用し、肝臓及び腎臓における活性酸素障害を抑制することに成功した。これらの知見は、癌や炎症性疾患に対する新しいタンパク質製剤の開発に対して有用な情報を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

近年のヒトゲノム解析および遺伝子工学の進展に伴い,多種多様な生理活性タンパク質の機能解析が進み,その医薬品としての開発が検討されている。過酸化水素分解酵素であるカタラーゼ(CAT)は,活性酸素障害が問題となる炎症性疾患などへの応用が期待されるが,その治療効果を最大限に引き出すにはドラッグデリバリーシステム(DDS)の概念に基づいた標的組織への部位特異的デリバリーが必要とされる。タンパク質を対象とした DDS 技術であるカチオン化は,負に帯電した細胞表面にタンパク質をデリバリー可能な方法であるが,カチオン化タンパク質医薬品を合理的に分子設計するうえで必要とされる分子構造一物性一体内動態に関する相関はいまだ明らかとされていない。

申請者は、カチオン化タンパク質の物理化学的性質と体内動態特性との関連を明らかにすることを目的に、ウシ血清アルブミン(BSA)をモデルタンパク質として選択し、ヘキサメチレンジアミン(HMD)あるいはエチレンジアミン(ED)を結合することでカチオン化 BSA を開発した。その結果、いずれの誘導体においてもカチオン化により二次及び三次構造が変化することが明らかとなり、アミノ基増加数と毛細管電気泳動度との間に良好な直線関係が得られた。マウス体内動態の検討からカチオン化 BSA は効率的に肝臓へ集積することが示された。速度論的解析により算出された肝臓取り込みクリアランスには閾値が存在したのに対し、分子構造は修飾率の増大とともに大きく変化したことから、カチオン化による肝臓デリバリーには至適カチオン化レベルの存在が示唆された。

以上の結果をもとに、申請者は、カチオン化 CAT を開発し活性酸素障害に対する抑制効果について検計した。合成の結果、ED 修飾により高修飾率かつ高い残存酵素活性を有する誘導体が得られた。ED-CAT は高い細胞結合性を示し、静脈内投与により肝臓に速やかに集積した。そこで四塩化炭素の投与により急性肝障害モデルマウスを作成したところ、血清中GOT、GPT、LDH 濃度の上昇ならびに肝臓 GSH 含量の減少は、ED-CAT により有意に抑制され、ED-CAT は活性酸素が関与する急性肝障害抑制に有効であることが示された。

次いで申請者は、活性酸素が関与する組織障害であるシスプラチン腎毒性の軽減を目的とした検討において、シスプラチン投与による血清中 BUN 及びクレアチニン濃度、肝臓中過酸化脂質の増大ならびに肝臓内 GSH 含量の減少が、ED-

CAT 投与により有意に抑制されることを証明した。さらに、マウスメラノーマ細胞株 B16-BL6/Luc を皮下移植することで作成した担癌マウスを用いた検討において、ED-CAT は、シスプラチンの急性毒性によるマウスの死亡を有意に抑制すること、その一方でシスプラチンによる抗腫瘍効果には影響しないことを見出した。以上の結果から、ED-CAT はシスプラチン腎障害を抑制可能であることが証明され、その併用によりシスプラチン毒性を軽減した抗癌治療の可能性が示された。以上、申請者は、カチオン化 BSA の物理化学的性質と体内動態特性との相関について系統的な検討を行うことで部位特異的デリバリーを達成するためのタンパク質医薬品の製剤設計に関する新たな指針を得るとともに、本手法を CAT に適用し、肝臓及び腎臓における活性酸素障害を抑制することに成功した。

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17年9月1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。