

|          |  |
|----------|--|
| 氏 名      | プラニート オパナスピット<br>Praneet Opanasopit  |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (薬 学)  |
| 学位記番号    | 薬 博 第 497 号  |
| 学位授与の日付  | 平成 14 年 3 月 25 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   | Effect of Serum Mannan Binding Protein on Tissue Disposition of Glycosylated Proteins and Liposomes<br>(糖修飾タンパク質およびリポソームの体内動態に及ぼす血清マンナン結合タンパク質の影響) |
| 論文調査委員   | (主 査)<br>教授 橋田 充 教授 高倉 喜信 教授 半田 哲郎   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

糖認識に基づくレセプター介在性エンドサイトーシスに代表される生体内の特異的認識機構を利用した薬物ターゲティングは、作用発現に特異性を欠く薬物の有効性を高める方法として有望である。種々の肝疾患において重要な役割を果たす肝臓の非実質細胞 (NPC) を構成する血管内皮細胞や Kupffer 細胞は、マンノースあるいはフコースを特異的に認識するレセプター (それぞれ MR, FR) を有することから、これらの糖構造を導入したキャリアを利用する薬物ターゲティングが試みられている。一方、血清中にはマンナン結合タンパク質 (MBP) が存在し、末端にマンノースおよび N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖に特異的に結合する。従って、NPC へのターゲティングを目的に糖修飾キャリアを投与した場合、MBP との相互作用の関与が考えられるが、こうした特異的分子認識を介する血清成分との相互作用が薬物キャリアの体内動態に及ぼす影響について検討された例はほとんどない。そこで著者は、先ず物理化学的性質の異なる各種マンノースおよびフコース修飾タンパク質を合成し、*in vivo* における MBP および肝臓のレセプターによる認識特性を薬動的に解析した。また、微粒子性キャリアに対する影響を検討し、マンノース修飾リポソーム (Man リポソーム) を用い MBP の結合によりマクロファージによる取り込みが促進されることを示した。さらに、Man リポソームを用いたマクロファージへの遺伝子導入についても検討を行い、この場合には MBP が遺伝子発現を阻害することを明らかにした。

#### I. マンノース修飾タンパク質のレクチンによる *in vivo* 認識に対する薬動的解析

ヒト型組換えスーパーオキシドデイスムターゼ (SOD: 分子量 32,000)、牛血清アルブミン (BSA: 67,000)、牛免疫グロブリン G (IgG: 150,000) を分子量の異なるモデル高分子として選択し、それぞれについて修飾率の異なるマンノース修飾体 (Man-SOD, Man-BSA, Man-IgG) を合成した。マウスを用いて  $^{111}\text{In}$  標識各修飾体の体内動態を検討した結果、Man-SOD は速やかに肝臓に取り込まれた。一方、BSA では一分子当たりのマンノース残基数が 12~16 個と少ない修飾体では Man-SOD と同様の結果が得られたが、25 個以上の修飾体では低投与量の場合血漿中での滞留が認められ、血漿成分との相互作用の影響が示唆された。さらに分子量の大きい Man-IgG では本現象はより顕著であった。そこで、マウス血清から精製した MBP を用い、血漿中での相互作用に MBP が関与することを確認し、さらに Man-BSA の分布実験の結果を、血漿中における飽和性結合過程および 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した結果、Man-BSA の肝臓による認識過程は糖修飾率の影響をあまり受けないこと、一方 MBP による認識は修飾率に敏感であり非常に強いクラスター効果が認められることを明らかにした。

#### II. フコース修飾タンパク質の体内動態の薬動的解析

修飾率の異なるフコース修飾 BSA (Fuc-BSA) を合成し、同様に体内動態解析を行った。修飾率が高い誘導体では MBP との弱い結合が認められ、肝臓構成細胞間分布を検討したところ、FR を発現する Kupffer 細胞による取り込みが最も高く、以下内皮細胞、肝細胞の順であった。Fuc-BSA の肝臓取り込みは過剰量の Man-BSA では阻害されず、Fuc-BSA あるいはガラクトース修飾 BSA (Gal-BSA) により阻害された。一方、過剰量の Fuc-BSA は Man-BSA の取り込

みを阻害したものの Gal-BSA の取り込みは阻害せず、Fuc-BSA の肝臓への取り込みは FR だけでは説明できないことが示唆された。

Ⅲ. マンノース修飾リポソームのレセプター介在性マクロファージ取り込みに及ぼす血清マンナン結合タンパク質の影響  
コレステロール (Chol) 骨格にマンノース構造を導入することにより作成したマンノース修飾 Chol (Man-C4-Chol) をジステアリルフォスファチジルコリン (DSPC) と Chol に添加することにより Man リポソームを調製した。対照として DSPC と Chol のみからなるリポソーム (DSPC リポソーム) も作成し、共に [<sup>3</sup>H] cholesteryl hexadecyl ether による放射標識を行い、粒子径を約 100nm に調整した。DSPC リポソームでは *in vitro* においてマウス腹腔マクロファージへの有意な取り込みはみられなかったのに対し、Man リポソームは Man-BSA で阻害される取り込みを示したことから MR を介して取り込まれることが確認された。MBP は Man リポソームと非常に強固に結合し、Man リポソームのマクロファージへの *in vitro* 取り込みおよび静注後の肝移行を促進した。一方、Man リポソームのマクロファージ取り込みは血清添加により逆に減少し、アルブミンなどの血清成分により Man リポソームの認識が一部阻害されることも示された。

#### Ⅳ. 正電荷マンノース修飾リポソーム介在性遺伝子導入に対する血清マンナン結合タンパク質の影響

Man リポソームの DDS への応用の例として、細胞選択的遺伝子デリバリーへの適用を検討し、これに対する MBP の影響を解析した。Man-C4-Chol とジオレオイルフォスファチジルエタノールアミンからなる正電荷 Man リポソームを調製し、蛍ルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA (pDNA) との混合比を最適化することにより粒子径約 200nm、ゼータ電位約 -40mV の複合体を得た。<sup>32</sup>P 標識 pDNA を用いた検討から腹腔マクロファージへの経時的な取り込みが観察された。この取り込みおよび遺伝子発現は BSA の添加では変化せず、一方 MBP 添加によって低下した。従って、MBP は pDNA/Man リポソーム複合体のマンノース残基に結合し、MR を介するマクロファージへの遺伝子導入を特異的に阻害することが示された。

以上、著者はマンノースあるいはフコース修飾を利用した薬物、遺伝子ターゲティングにおける MBP の影響を解明することを目的に、修飾タンパク質およびリポソームのレセプター介在性肝臓取り込みに対する血清 MBP 結合の影響について定量的に解析した。本研究の結果は、MBP の結合による修飾タンパク質の血漿滞留化、修飾リポソームの取り込み促進、あるいは pDNA/修飾リポソーム複合体の取り込み、遺伝子発現の阻害など、血液中での特異的な分子認識による相互作用が送達効率に多大な影響を与えることを証明するものであり、今後マクロファージ等への薬物、遺伝子キャリアとして注目されるマンノースあるいはフコース修飾キャリアを設計、開発する上で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

近年、糖認識に基づくレセプター介在性エンドサイトーシスを利用した薬物ターゲティングが注目を集め、中でも肝臓の非実質細胞 (NPC) を構成する血管内皮細胞や Kupffer 細胞がマンノースあるいはフコースを特異的に認識するレセプター (MR, FR) を有することから、これらの糖構造を導入したキャリアの開発が進められている。一方、血清中にはマンナン結合タンパク質 (MBP) が存在し、末端にマンノースなどを有する糖鎖に特異的に結合するが、こうした特異的な分子認識を介する血清成分との相互作用がキャリアの体内動態に及ぼす影響に関する情報はほとんどない。著者は、各種糖修飾タンパク質を合成し、*in vivo* における MBP および肝臓のレセプターによる認識特性を薬動的に解析すると共に、微粒子性キャリアの動態および Man リポソームを用いたマクロファージへの遺伝子導入に及ぼす MBP の影響について検討を行った。

最初に、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、牛血清アルブミン (BSA)、および牛免疫グロブリン G (IgG) に対し修飾率の異なるマンノース修飾体 (Man-SOD, Man-BSA, Man-IgG) を合成し、マウスを用いて <sup>111</sup>In 標識各修飾体の体内動態を検討した結果、BSA ではマンノース残基数が少ない修飾体は速やかに肝臓に取り込まれ、一方、修飾率の高い修飾体は低投与量の場合血漿中に滞留し血漿成分との相互作用の影響が示唆された。そこで、マウス血清から精製した MBP を用いて上記現象への関与を確かめ、さらに Man-BSA の分布実験の結果を、血漿中における飽和性結合過程および 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し、Man-BSA の肝臓による認識に対しては糖修飾率の影響は小さく、一方、MBP による認識は修飾率に敏感で強いクラスター効果が認められるこ

とを明らかにした。また、同様にフコース修飾 BSA (Fuc-BSA) の体内動態解析を行った結果、修飾率が高い誘導体では MBP との弱い結合が認められ、一方、肝臓構成細胞間分布に関しては FR を発現する Kupffer 細胞が最も高い取り込みを示すことを確認した。次に、コレステロール (Chol) 骨格にマンノース構造を導入したマンノース修飾 Chol (Man-C4-Chol) をジステアリルフォスファチジルコリン (DSPC) と Chol に添加することにより Man リポソームを調製し、DSPC と Chol のみからなる対照リポソーム (DSPC リポソーム) と動態を比較した結果、DSPC リポソームでは *in vitro* でマウス腹腔マクロファージへの有意な取り込みは認められなかったのに対し、Man リポソームは Man-BSA で阻害される取り込みを示し MR を介する取り込みが確認された。一方、MBP は Man リポソームと強固に結合しマクロファージへの *in vitro* 取り込みおよび静注後の肝移行を促進し、逆に血清添加は取りこみを減少させた。更に、Man リポソームを用いた細胞選択的遺伝子デリバリーに対する影響を検討し、正電荷 Man リポソームとプラスミド DNA (pDNA) の複合体において、腹腔マクロファージへの経時的取り込みおよび遺伝子発現が MBP の結合により低下し、MR を介するマクロファージへの遺伝子導入が特異的に阻害されることが示された。

以上、著者はマンノースおよびフコース修飾タンパク質あるいはリポソームのレセプター介在性肝臓取り込みに対する血清 MBP 結合の影響について定量的に解析し、マクロファージなどへの薬物ターゲティング法として期待される糖修飾キャリアの設計、開発に有益な指針を得た。

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14年2月21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。