

氏名	高木敏英
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第434号
学位授与の日付	平成11年3月23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	薬学研究科薬品作用制御システム専攻
学位論文題目	マクロファージにおける高分子医薬品の細胞内動態制御と効果改善に関する研究 (主査)
論文調査委員	教授 橋田 充 教授 高倉喜信 教授 乾 賢一

論文内容の要旨

近年、生理活性タンパク質や遺伝子医薬品等の高分子医薬品を用いた新しい薬物治療法が注目されているが、これらが活性を発現するためには細胞内の標的作用部位へ効率よく送達されなくてはならない。従って、高分子医薬品を用い有効な治療を行うためには、個体レベルにおける体内動態のみならず、標的細胞における細胞レベルでの動態を詳細に検討し薬効発現との関係を明らかにすることが必要不可欠と考えられる。著者は、生体内で異物排除や免疫などにおいて重要な役割を演じ、高分子医薬品の標的細胞としてのみならず全身体内動態を規定する細胞としても重要と考えられるマクロファージを対象として、物理化学的性質や細胞内作用部位が異なる3種の高分子医薬品の細胞取り込み動態を解析し、それぞれの生物学的効果との関連を検討した。また、得られた情報に基づき、高分子医薬品を用いた治療最適化のための細胞内動態制御法の開発指針の確立を試みた。

I. 化学修飾によるsuperoxide dismutaseの細胞膜親和性および活性酸素消去能の改善

生理活性タンパク質としてsuperoxide dismutase (SOD) を選び、マクロファージの細胞膜に存在するNADPH oxidaseより産生される種々の炎症性疾患に関与しているスーパーオキシドアニオンを効率的に消去することを目的に、SODに化学修飾を施しその効果を評価した。培養マウス腹腔マクロファージを用いて活性酸素消去能および細胞取り込み動態を評価した結果、未修飾SODがほとんど取り込まれず全く効果を示さなかったのに対し、分子全体として正電荷を導入したカチオン化SOD (Cat-SOD) は負電荷を有する細胞膜と強い静電的相互作用を示すと共に吸着性エンドサイトーシスの機構に基づき取り込まれ、優れた活性酸素消去作用を示した。また内在化を阻害することによって効果が減弱したことから、細胞膜表面に結合したCat-SODのみならずエンドサイトーシスを受けたものもマクロファージから放出される活性酸素の消去に寄与することが明らかとなった。さらに、レセプター介在性エンドサイトーシスにより取り込まれるマンノース修飾SODと比較したところ、Cat-SODはより優れた効果を示し、細胞取り込み機構の違いに由来する細胞内動態の差が影響しているものと考えられた。以上の結果より、SODにカチオン化修飾を施すことにより、マクロファージ由来の活性酸素が関与する各種疾患に対する有効な治療薬となる可能性が示された。

II. アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞内動態に及ぼすカチオン性リポソームの影響

次に、病因遺伝子の発現を特異的に抑制することにより治療効果を発現するアンチセンスオリゴヌクレオチド (Oligo) をとりあげ、マクロファージに存在するnitric oxide (NO) 合成酵素inducible NO synthase (iNOS) に対するOligoをモデルに用いて検討を行った。NO産生阻害を指標にアンチセンス効果を評価したところ、phosphorothioate化されたS-Oligoが配列特異的な効果を示したものの、高濃度かつ長時間の処理が必要であった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光標識体の細胞取り込みと細胞内動態を検討した結果、経時的な細胞内への移行が確認されたが、標的分子であるmRNAが存在す

る核やサイトゾルへの移行はほとんど認められず、エンドソームやリソソーム内への局在を示唆する顆粒状の細胞内分布が観察された。そこでカチオン性リポソームとの複合体形成の効果を検討した結果、ヒト前単球細胞株U937細胞においてはS-Oligoの核への移行が顕著に促進されたが、マクロファージにおいては大きな細胞内動態の変化は観察されず、わずかにアンチセンス効果の改善が認められるにとどまった。以上の結果より、アンチセンス効果発現におけるOligoの細胞内動態の重要性が明らかとなり、さらにマクロファージにおいてはカチオン性リポソームの効果は不十分で、他の動態制御法の導入が必要であることが示された。

III. プラスミドDNAの取り込みとマクロファージ活性化

さらに、遺伝子治療において非ウイルスベクターとして用いられ、細胞内の標的部位が核に限定されるプラスミドDNA (pDNA) を対象に検討を行った。負電荷を帯びた巨大分子であるにも関わらず、マクロファージにpDNAが速やかに取り込まれることが明らかとなったが、遺伝子発現は全く認められず核への移行が大きく制限されていることが示唆された。一方、pDNAの取り込みに伴い、大量のtumor necrosis factor- α (TNF- α) の誘導などが認められ、マクロファージの活性化が示された。取り込み特性を解析した結果、pDNAの持つポリアニオンとしての物理化学的性質を認識する何らかの機構の関与が示唆され、リガンド認識特性にポリアニオンの立体構造を特異的に認識するスカベンジャーレセプター (SR) との類似性が認められたので、最も良く知られるクラスAのSR (SRA) を安定に発現するCHO細胞およびSRAのノックアウトマウスから採取した腹腔マクロファージを用いて検討を行った結果、pDNAの取り込みにはSRAは関与せず、他の機構によることが明らかになった。また、負電荷を持つ種々のタンパク質、多糖類、核酸を用いて詳細な検討を行った結果、マクロファージによるpDNAの取り込み特性と活性化現象との関連を明らかにすることができた。

以上、著者は従来情報の乏しかったマクロファージにおける高分子医薬品の細胞内動態と生物学的な効果発現との関係を検討し、治療最適化の実現に必要なデリバリーシステムの設計指針の基礎となる知見を得た。これらの知見は、高分子医薬品を用いた有効かつ安全な薬物治療法を確立するための有用な情報となるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

生理活性タンパク質や遺伝子医薬品等高分子医薬品が治療効果を発現するためには、細胞内の標的作用部位へ効率よく送達されなくてはならず、全身動態だけでなく標的細胞における細胞レベルでの動態解析が重要と考えられる。著者は、生体内で異物排除や免疫に重要な役割を演じ、高分子医薬品の標的細胞であるとともに全身動態を規定する細胞としても重要と考えられるマクロファージを対象に、物理化学的性質や細胞内作用部位が異なる3種の高分子医薬品の細胞取り込み動態を解析し、生物学的効果との関連を検討した。最初に、生理活性タンパク質superoxide dismutase (SOD) を選び、種々の炎症性疾患に関与するスーパーオキシドアニオンを効率的に除去することを目的に、SODに化学修飾を施しその効果を評価した。培養マウス腹腔マクロファージを用いて活性酸素除去能および細胞取り込み動態を評価した結果、未修飾SODが取り込み効果共示さなかったのに対し、正電荷を導入したカチオン化SOD (Cat-SOD) は負電荷を有する細胞膜と強い静電的相互作用を示すと共に吸着性エンドサイトーシスの機構に基づき取り込まれ、優れた活性酸素除去作用を示した。また、Cat-SODの効果はレセプター介在性エンドサイトーシスにより取り込まれるマンノース修飾SODを上回り、細胞内動態の影響が示唆された。次に、病因遺伝子の発現を特異的に抑制することにより治療効果を発現するアンチセンスオリゴヌクレオチド (Oligo) をとりあげ、NO合成酵素 (iNOS) に対するOligoをモデルに用いて検討を行った。NO産生阻害を指標にアンチセンス効果を評価した結果、phosphorothioate化されたS-Oligoが配列特異的な効果を示したものの高濃度かつ長時間の処理が必要であり、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、標的分子であるmRNAが存在する核やサイトゾルではなくエンドソームやリソソーム内への局在を示唆する顆粒状の細胞内分布が観察された。そこでカチオン性リポソームとの複合体形成の効果を検討した結果、ヒト前単球細胞株U937細胞においてはS-Oligoの核への移行が顕著に促進されたが、マクロファージにおいては大きな細胞内動態の変化は観察されず、カチオン性リポソームの効果は不十分で他の動態制御法の導入が必要であることが示された。さらに、細胞内の標的部位が核に限定されるプラスミドDNA (pDNA) を対象に検討を行った結果、負電荷を帯びた巨大分子であるにも関わらず、マクロファージにpDNAが速やかに取り込まれること

が明らかとなったが、遺伝子発現は全く認められず核への移行が制限されていることが示唆された。取り込みには、ポリアニオンとしての認識に基づく何らかの機構の関与が示唆されたが、クラスAのスキャンジャーレセプターの関与は否定された。一方、pDNAの取り込みに伴い、tumor necrosis factor- α (TNF- α) の誘導などマクロファージの活性化が認められ、負電荷を持つ種々のタンパク質、多糖類、核酸を用いて検討を行った結果、pDNAの取り込み特性と活性化現象の関連が明らかにされた。

以上、著者は従来情報の乏しかったマクロファージにおける高分子医薬品の細胞内動態と生物学的な効果発現との関係を検討し、治療最適化の実現に必要なデリバリーシステムの設計指針の基礎となる知見を得た。

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11年2月18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。