

氏 名	かめ やま しょう じゅ 亀 山 松 寿
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 740 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 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	細胞透過ペプチド/免疫グロブリン複合体の静脈内投与時の体内分布及び細胞内移行に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 二 木 史 朗 教 授 松 崎 勝 巳 教 授 中 山 和 久

論 文 内 容 の 要 旨

序 論

免疫グロブリン製剤はウイルスや細菌等に対する抗体を多く含有し、感染症の予防や治療に広く使用されている。しかし、これらの抗体は、血管内や体液内では効果を発揮するものの、感染後に細胞内や組織内に潜在化したウイルスや細菌等に対しては、感染細胞の細胞膜を透過できないため、十分な効果を発揮することはできない。最近、アルギニンに富んだ一連のペプチドが高分子物質を細胞内に移行させることが明らかとなり、数多くの研究が報告されるようになった。申請者は、この細胞透過ペプチドを免疫グロブリンの Fab 断片に結合させ、細胞内移行能、組織移行能を有した新たな薬剤へ応用することを目的として以下の検討を行った。

第 1 章：HIV-1 REV ペプチド/免疫グロブリン Fab 複合体の静脈内投与時のラット体内分布に関する検討

免疫グロブリン Fab 断片に細胞透過能を有する HIV-1 REV (34-50) ペプチドを結合させた複合体を雄性ラットに単回静脈内投与し、血液中動態及び体内分布について未修飾 Fab 断片と比較した。クロラミン T 法により ^{125}I で標識した被験サンプル（それぞれ ^{125}I -REV-Fab, ^{125}I -nFab）を 2 mg/kg (3 Mbq/kg) の投与量で静脈内投与し、血液中の総放射能及びトリクロロ酢酸 (TCA) 不溶性放射能、尿中排泄率及び全身オートラジオグラフィー (全身 ARG) を測定した。血中及び血漿中濃度は、総放射能及び TCA 不溶性放射能のいずれにおいても、投与初期において ^{125}I -REV-Fab 投与の方が ^{125}I -nFab 投与よりも顕著に低く、その後いずれも二相性で減少し、終末相での消失は ^{125}I -REV-Fab 投与の方が緩やかであった。次に投与 4 時間後の体内分布を全身 ARG で調べた。 ^{125}I -REV-Fab 及び ^{125}I -nFab のいずれも、甲状腺、胃内容物、腎臓皮質及び皮膚に高い放射能が認められ、脳、脊髄及び眼球ではほとんど放射能が認められなかった。なお、 ^{125}I -REV-Fab を投与した場合は、副腎、脾臓及び肝臓で、 ^{125}I -nFab を投与した場合よりも顕著に高い放射能が認められた。尿中排泄率については、 ^{125}I -nFab 及び ^{125}I -REV-Fab 共に、投与後 24 時間までに投与量の約 70% が遊離の ^{125}I を含む低分子量成分として排泄され、その差はほとんど認められなかった。以上の結果から、 ^{125}I -REV-Fab はラットに静脈内投与した時、投与初期において血液中から副腎、脾臓、肝臓などの組織に速やかに移行すると推察された。また、主排泄経路は尿であることが示された。

第 2 章： ^{125}I 標識 Fab 断片のラット体内分布に及ぼす細胞透過ペプチド結合の影響に関する検討

クロラミン T 法により放射性ヨード標識した Fab 断片に、細胞透過ペプチドとして、HIV-1 TAT (48-60), Antennapedia (43-58) 及び HIV-1 REV (34-50) の配列をもつペプチドを化学的に結合させ、それぞれの複合体 TAT- ^{125}I -Fab, ANP- ^{125}I -Fab, REV- ^{125}I -Fab を調製した。全身 ARG は、薬剤投与 4 時間後、及び 24 時間後の 2 点で分析した。TAT- ^{125}I -Fab では肝臓、脾臓、ANP- ^{125}I -Fab では脾臓、副腎、肝臓、REV- ^{125}I -Fab では脾臓、副腎、腎臓髓質及び肝臓で高い濃度の放射能が認められた。脳及び脊髄への取り込みは、いずれのペプチドを使用した場合でも認められなかった。以上の結果より、細胞透過ペプチドの種類によって、 ^{125}I -標識 Fab 断片の体内分布が変化し、肝臓、副腎、脾臓及び腎臓髓

質への臓器分布及び滞留性は異なることが明らかとなった。

第3章：細胞透過ペプチド/免疫グロブリンFab複合体のHeLa細胞内取り込みに関する検討

第2章と同様にTAT-¹²⁵I-Fab, ANP-¹²⁵I-Fab, REV-¹²⁵I-Fabを調製し、HeLa細胞への取り込みを検討した。これらのペプチドは塩基性アミノ酸に富み細胞表面に強く吸着することから、しばしば、細胞内への取り込み量を過大に評価することがある。そこで、放射性ヨード標識したFab断片と細胞透過ペプチド複合体（CPP-¹²⁵I-Fab）の細胞表面吸着を取り除くため、0.2M glycine-0.15M NaCl（pH3.0）の酸性緩衝液による細胞の洗浄を行った。この酸性緩衝液による洗浄は細胞表面に結合したリガンドの遊離などによく用いられており、細胞表面への吸着を除去することにより細胞内取り込み量を効果的に区別することができると考えられる。この手法を用いた検討の結果、添加5分以内の早い時間でかなりの量のCPP-¹²⁵I-Fabが細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。また、これらの複合体の細胞内取り込みはエンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスの阻害剤によって有意に阻害されることから、取り込みにおけるこれらの経路の関与が明らかとなった。その阻害の程度は、細胞への複合体の取り込みと同様、REV-¹²⁵I-Fab > TAT-¹²⁵I-Fab ≥ ANT-¹²⁵I-Fabの順であった。さらに、この方法を用いて、ヘパリン存在下でのCPP-¹²⁵I-Fabの細胞移行量を検討した結果、それぞれのペプチドによって細胞表面の硫酸化多糖への親和性や細胞移行量が異なることが明らかとなった。

本研究結果は、Fab断片をはじめとする免疫グロブリンの細胞内導入機序を考える上で重要な知見であり、各種抗体の細胞内導入や組織内移行を目的とした薬剤の開発を進める上で貴重な情報を与えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

免疫グロブリンは、各種抗原との特異性や高い親和性ゆえに、従来から医薬品や試薬に使用されてきたが、高分子量のタンパク質であるために血液内やリンパ液内など細胞外の限られた範囲での使用に制限されていた。近年、様々な塩基性細胞透過ペプチドをキャリアとして用いた生理活性物質の細胞内導入が報告されている。申請者は、細胞透過ペプチドを免疫グロブリンのFab断片に結合することで、細胞内移行能、組織移行能を有した新たな薬剤へ応用することを目的として、細胞透過性ペプチドと免疫グロブリンFabとの複合体（化学的架橋体）の静脈内投与時のラット体内動態ならびに細胞内移行機序に関して検討した。

まず、体内動態を明らかにするため、細胞透過ペプチドとしてHIV-1 REV（34-50）ペプチドを用い、これと免疫グロブリンのFab断片を化学的に架橋後、¹²⁵I標識して、雄性ラットに単回静脈内投与し、血液中動態及び体内分布について未修飾Fab断片と比較した。¹²⁵Iで標識した被験サンプル（それぞれ¹²⁵I-REV-Fab, ¹²⁵I-nFab）を静脈内投与し、血液中の総放射能及びトリクロロ酢酸（TCA）不溶性放射能を測定するとともに、全身オートラジオグラフィー（ARG）を行った。血液中及び血漿中濃度は、総放射能及びTCA不溶性放射能のいずれにおいても、投与初期には¹²⁵I-REV-Fab投与の方が¹²⁵I-nFab投与よりも顕著に低く、その後、二相性で減少した。また、投与4時間後の体内分布を全身ARGで調べたところ、共に甲状腺、腎臓皮質及び皮膚などに高い放射能が認められたが、¹²⁵I-REV-Fabを投与した場合には、顕著に高い放射能が副腎、脾臓及び肝臓に認められた。これらの結果から、¹²⁵I-REV-Fabはラットに静脈内投与した時、特に副腎、脾臓、肝臓などの組織に速やかに移行することが示唆された。

次に、細胞透過性ペプチドが¹²⁵I標識Fab断片のラット体内分布に及ぼす影響を検討した。¹²⁵I標識したFabに、塩基性細胞透過ペプチドとして、HIV-1 TAT（48-60）、Antennapedia（ANP）（43-58）、HIV-1 REV（34-50）由来のペプチドを架橋して得られた複合体をラットにそれぞれ静脈内投与し、4時間後、及び24時間後の全身ARGで体内分布を比較した結果、膜透過ペプチドとしてTATを用いた場合には肝臓、脾臓に、ANPを用いた場合には脾臓、副腎、肝臓に、REVを用いた場合には脾臓、副腎、腎臓髓質及び肝臓において特に高い放射能が認められた。以上により、塩基性を有する膜透過ペプチド間においても、それらのFab複合体の肝臓、副腎、脾臓及び腎臓髓質などの臓器分布や滞留性に有意な差が得られることが明らかとなった。

さらに、これらの複合体の細胞移行様式についてHeLa細胞を用いて比較した。この際、細胞透過ペプチドが細胞表面に付着残存することを排除するため、酸性緩衝液による細胞洗浄を行ったところ、温度依存性や阻害剤の影響が明確になり、この洗浄方法が細胞透過ペプチド/Fab複合体の細胞内取り込み機序を検討する上で有用な方法であることが示唆された。こ

の方法を用いることにより、各複合体の細胞内取込みが添加後5分以内の早い時間でも行われることが明らかとなった。また、細胞への取込まれやすさや、各種阻害剤の影響、細胞表層のプロテオグリカンとの親和性が互いに異なることも明らかとなり、塩基性を有する膜透過ペプチド間においても複合体の細胞内取込み機序が同一ではないことが示唆された。

以上、本研究は、Fabをはじめとする免疫グロブリンの細胞内導入や組織移行を研究する上で重要な知見であり、免疫グロブリンの効力を今まで以上に発揮させる医薬品や試薬を開発して行く上でも、貴重な情報になりうるものと考ええる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成19年9月25日に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。