

氏 名	おお が わら けん いち 大 河 原 賢 一
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 631 号
学位授与の日付	平 成 12 年 7 月 24 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	肝臓特異的認識素子導入高分子および微粒子性薬物キャリアーの肝臓移行動態と薬動学的特性に関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 橋 田 充	教 授 川 寄 敏 祐	教 授 高 倉 喜 信
--------	--------------------	-------------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

近年、薬物治療を有効かつ安全に行うことを目的として、標的作用部位に親和性を有する物質をキャリアーに用い、薬物を選択的に送達する薬物ターゲティングの試みが活発に進められている。とりわけ肝臓には、糖鎖認識機構に代表される厳密な基質認識性を有する取り込み機構が細胞特異的に存在するため、肝臓を標的とした細胞選択的ターゲティングの実用化が期待されている。しかしながら、本分野の研究の多くは試行錯誤的に進められており、優れた細胞選択性を有する薬物キャリアーを合理的に設計、開発するためには標的細胞、臓器と薬物キャリアーとの相互作用に関する薬動学的、機構論的な視点に基づく解析が不可欠であると考えられる。

著者は、肝臓を構成する各細胞に存在する種々の receptor-mediated endocytosis の機構を利用したターゲティングシステムの開発に必要な基礎情報の蓄積を目的として、最初に認識素子導入高分子のモデルとして、牛血清アルブミン (BSA) の糖修飾体および各種タンパク質の負電荷導入体を用い、ラット肝臓実験系における標的細胞との相互作用に関して薬動学的な解析を行った。さらに微粒子性薬物キャリアーのモデルとして、ポリスチレンマイクロスフェア (MS) を選び、特に血液成分との相互作用および粒子サイズによる細網内皮系組織への移行性の差違に着目して、肝臓への取り込みおよび取り込み後の動態に関する系統的な検討を行った。

I. 肝臓特異的認識素子導入タンパク質の肝取り込み特性の解析

糖修飾高分子の肝取り込み過程を定量的に評価するため、モデル高分子として BSA を選択し、ガラクトースあるいはマンノース修飾 BSA の肝取り込み過程をラット肝臓実験系を用いて解析した。糖修飾 BSA の糖認識に基づく細胞選択的な肝取り込み量は BSA 表面に結合させる糖残基の表面密度が大きくなるにしたがって高くなることが示され、さらに薬動学的モデルを用いた解析より、糖残基の表面密度が上昇するに伴い、細胞表面に存在するレセプターに対する親和性が高くなるのに対し、細胞表面への最大結合量は逆に減少することが明らかとなり、糖残基の表面密度の大きな誘導体が、より多くのレセプターと多点で結合し、結果として細胞表面を相対的に大きく占有することが示唆された。また、糖残基の表面密度がレセプターへの結合過程だけでなく内在化速度定数にも影響を与えることが定量的に示された。次に、負電荷導入高分子の肝取り込み過程を定量的に評価するため、分子量の異なる 4 種のタンパク質 (lysozyme, superoxide dismutase, BSA, catalase) を用い、それぞれのサクシニル化修飾体の肝臓実験系における取り込み動態を解析した。実験の結果、負電荷導入タンパク質の肝臓への取り込みにはスカベンジャーレセプター様の機構が関与していることが確認され、また効率的に肝臓に取り込まれるためには、タンパク質自身がある程度以上の分子量を持つ必要があることが示された。一方、負電荷導入体の肝臓における取り込み部位としては、非実質細胞の中でも血管内皮細胞が大部分を占めることも確かめられた。さらに薬動学的モデルを用いた解析の結果、負電荷導入高分子が、糖修飾体と同程度あるいは若干これを上回る親和性および比較的大きな内在化速度を有することが示された。以上の結果より、ガラクトース修飾は肝臓の実質細胞に対する、またマンノース修飾および負電荷導入は非実質細胞に対する細胞選択的送達法として有用であることが示され、合わせて分子設計に必要な高分子全体のサイズや認識素子の数、密度が与える影響について、定量的な情報を得た。

II. 微粒子性薬物キャリアーの肝臓移行動態の解析と取り込み機構の検討

微粒子性薬物キャリアーの体内動態とそれに及ぼす各種要因の影響を評価するため、粒子サイズの異なる二種の MS (50 nm, MS-50 ; 500 nm, MS-500) をモデルに用いて検討を行った。いずれの MS とも静脈内投与後速やかに血中から消失し大部分が肝臓へ集積したが、MS-500 が主に Kupffer 細胞に取り込まれるのに対して、MS-50 では約30%が実質細胞にも移行することが示され、微粒子性薬物キャリアーの肝移行においては、肝臓の解剖学的特性と粒子サイズとの関係が細胞選択性を決定する要因の一つであることが示された。次に、肝灌流実験系を用いて肝臓への取り込みに及ぼす血液成分との相互作用の影響を検討した結果、MS の肝取り込みは血清中のオプソニン活性をもつタンパクの表面吸着により促進され、オプソニンが関与するレセプター介在性の機構が関与していることが示された。さらに、血清中の取り込み促進因子に加え、吸着により MS の表面疎水性を低下させるアルブミンに代表される血清中因子が取り込みに抑制的に働くことも明らかとなり、両因子の寄与のバランスが粒子サイズとさらに連関して最終的に MS の肝臓への移行性を支配していることが示唆された。以上の結果より、微粒子性薬物キャリアーの肝臓移行においては、血液成分が大きく影響し、粒子のサイズや表面特性などの選択、設計においては、各種血液中因子との相互作用を総合的に考慮する必要があることが示された。一方、実質細胞に取り込まれた MS-50 は胆汁中に一部排泄されることが明らかとなり、特定のレセプターを介して取り込まれた際に生じる膜ベシクルが最終的に胆管膜と融合することによるいわゆるベシクル輸送が、細胞内輸送を担い胆汁排泄をもたらしている可能性が推察された。

以上、著者は肝臓特異的認識素子を有する水溶性高分子および微粒子性薬物キャリアーの肝臓移行動態を解析し、細胞選択的ターゲティングシステムの設計指針となる基礎的情報を得た。これらの知見は、低分子薬物やタンパク質医薬品などさまざまな物性を有する医薬品に対する細胞選択的ターゲティングシステムの合理的設計、開発に有益な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、糖鎖認識機構に代表される厳密な基質認識性を有する取り込み機構が存在することから、肝臓を標的とする細胞選択的薬物ターゲティング法の開発が注目を集めている。しかし、細胞選択性を有する薬物キャリアーの合理的設計に必要な標的細胞、臓器とキャリアーとの相互作用に関する薬動学的、機構論的な視点に基づく解析は未だ十分には行われていない。著者は、肝臓を構成する各細胞に存在する種々の receptor-mediated endocytosis の機構を利用したターゲティングシステムの開発に必要な基礎情報の蓄積を目的として、高分子キャリアーのモデルであるタンパク質の糖修飾体、負電荷導入体と微粒子性キャリアーのモデルであるポリスチレンマイクロスフェアの肝臓への取り込みおよび取り込み後の動態を系統的に解析した。最初に、牛血清アルブミン (BSA) のガラクトースあるいはマンノース修飾体の肝取り込み過程をラット肝灌流実験系を用いて定量的に解析した結果、糖修飾 BSA の糖認識に基づく細胞選択的な肝取り込み量が結合糖残基数の増大と共に大きくなることが明らかになった。さらに、薬動学的解析により、糖残基の表面密度の上昇に伴い細胞表面に存在するレセプターに対する親和性が高くなるのに対し、最大結合量は逆に減少することが明らかになり、糖残基の表面密度の大きな誘導体がより多くのレセプターと多点で結合する結果細胞表面を相対的に大きく占有することが示唆された。また、糖残基の表面密度がレセプターへの結合過程だけでなく内在化速度にも影響を与えることも示された。次に、各種タンパク質のサクシニル化修飾体の肝取り込み動態を解析した結果、取り込みは主として血管内皮細胞で起こりその際ヌカベンジャーレセプター様の機構が関与することが確認された。また効率的な取り込みには分子サイズが条件となることが示され、さらに糖修飾体と同程度あるいはこれを上回る親和性と比較的大きな内在化速度を有することも示された。一方、微粒子性薬物キャリアーの体内動態とそれに及ぼす各種要因の影響を評価するため、平均粒子径が 50 nm と 500 nm の 2 種類のマイクロスフェア (MS-50, MS-500) を用いて検討を行った結果、何れも静脈内投与後速やかに血中から消失し肝臓へ集積するが、MS-500 が主に Kupffer 細胞に取り込まれるのに対して MS-50 では30%が実質細胞にも移行することが示され、粒子サイズと解剖学的特性の関係が細胞選択性を与える要因の一つであることが示された。次に、肝灌流実験系を用いて血液成分との相互作用の影響を検討した結果、肝取り込みはオプソニン活性を持つタンパクの表面吸着により促進され、逆に表面吸着により表面疎水性を低下させるアルブミン等により抑制されることが明らかとなり、両因子の寄与のバランスが粒子サイズ

と関連して肝臓への移行性を支配していることが示唆された。さらに、取込みに関与する血清および血漿中因子および細胞側レセプターについても実体の一端が明らかにされた。

以上、著者は肝臓特異的認識素子を有する水溶性高分子および微粒子性薬物キャリアーの肝臓移行動態を解析し、細胞選択的ターゲティングシステムの設計指針となる基礎的情報を得た。これらの知見は、低分子薬物やタンパク質医薬品などさまざまな物性を有する医薬品の細胞選択的ターゲティングシステムの合理的設計、開発に有益な指針を提供するものと思われる。

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12年6月28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。