



Title	薬物治療の最適化を充たす水溶性高分子ハイブリッド化生理活性タンパク質の分子設計に関する研究
Author(s)	堤, 康央
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40929
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	堤 つづみ 康 やす 央 お
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 3 8 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 8 月 7 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	薬物治療の最適化を充たす水溶性高分子ハイブリッド化生理活性タンパク質の分子設計に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 真弓 忠範 (副査) 教 授 馬場 明道 教 授 溝口 正 教 授 西原 力

論 文 内 容 の 要 旨

分子生物学の格段の進歩により、各種疾病が分子レベルで解明されてきており、種々のサイトカインの過不足が、往々にして重篤な病態の形成や進行の主因となっていることが判明しつつある。このため、サイトカインを癌やウイルス疾患に対する夢の治療薬として適用しようとする試みに、熱い眼差しが寄せられている。しかしながら、サイトカインは体内滞留性に極めて乏しいうえ、多様な生理活性を有するために副作用制御が困難であり、極度に臨床応用が制限されてしまっている。これらの問題はサイトカインに限らず、近年大量生産可能になった数多くの生理活性タンパク質にも当てはまることがある。内因性サイトカインは、糖鎖修飾により然るべき生体内安定性とレセプター親和性を付与されており、生体内環境との有機的連関を維持しつつ、必要とする生理作用のみを効率的に発揮している。従って、サイトカインを次世代の医薬品として開拓していくためには、in vivo における詳細なサイトカインネットワーク機構等の解析と共に、生体内不安定性を克服できる DDS の開発、およびサイトカインの多様な生理作用の中から目的とする作用を分離できる創薬技術の開発が不可欠となる。そこで本研究では、夢の抗癌剤として期待されている腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor ; TNF- α) をモデル生理活性タンパク質 (サイトカイン) として用い、「薬物治療の最適化を充たす水溶性高分子ハイブリッド化生理活性タンパク質の分子設計に関する研究」を試みた。

TNF- α は、腫瘍を特異的に傷害するサイトカインとして見いだされ、夢の抗癌剤として一躍脚光を浴びた。しかしながら、体内安定性が極めて乏しいために大量頻回投与を余儀なくされ、TNF- α の全身投与により発熱、血圧低下、エンドトキシン様ショック等の重篤な副作用が発現してしまっている。このため、TNF- α を全身性の抗腫瘍薬として用いる場合、その投与量は、抗腫瘍作用発現に必要な量の僅か 1/5~1/25 に制限せざるを得ないのが現状である。そこで私は、TNF- α の抗腫瘍効果増強、副作用軽減を目的に、水溶性高分子によるハイブリッド化を試みた。ハイブリッド化サイトカインの体内挙動は、タンパク質表面を覆う修飾高分子の諸性質により著しく左右されてしまうため、まず個々の生理活性タンパク質の諸性質やハイブリッド化の目的に応じた最適の修飾高分子を選択しなければならない。TNF- α の抗腫瘍効果は、直接的な腫瘍細胞傷害だけでなく、血中の抗腫瘍エフェクター免疫細胞の賦活化や腫瘍血管の特異的傷害 (腫瘍出血壊死) により発揮されることが知られている。また出血壊死作用のプロセスの中で、腫

瘍血管の血管透過性のみが特異的に亢進することが判明しているので、結局のところ血中滞留性を向上させれば、TNF- α の抗腫瘍作用機序全ての点において、作用の増強が図れるものと考えられる。そのうえ、肝臓や脾臓等に移行してしまった TNF- α が副作用の主因となるため、血中滞留性の向上に伴うこれら正常組織への移行性の低下は、副作用軽減に直結するものと期待できる。そこでまず、血中滞留性の向上を目的とした Bioconjugation に適した修飾高分子を見いだすために、種々の修飾高分子と血管内皮細胞の相互作用強度を検討した。その結果、非電荷水溶性高分子が、血中滞留性の向上を目的としたハイブリッド化に最も適することが示唆された。そこで安全性の高い Polyethylene Glycol (PEG) を修飾高分子として用い、TNF- α をハイブリッド化した。癌組織移行性やプロテアーゼ等の生体内因子との有機的連関、活性-修飾率-分子サイズの兼ね合い等のバランスが最適であった PEG 化 TNF- α (MPEG-TNF- α) の in vivo における抗腫瘍効果は、未修飾 TNF- α の 100 倍以上にも増強されていた。この MPEG-TNF- α を 200 単位/マウスの用量で、週 2 回合計 4 回の静脈投与をすることで、全例において完全治癒が達成できた。また未修飾 TNF- α では、抗腫瘍効果が殆ど認められなかった 10,000 単位/マウスの投与量ですら、体重減少、突然死、血小板減少等の強い副作用が観察されたが、MPEG-TNF- α では、全例の完全治癒が得られた投与量の 5 倍量 (1,000 単位/マウス) でも、これらの副作用は全く認められなかった。この様にサイトカインの生体内安定化を果たしたうえで、さらにサイトカインの多様な生理作用の中から目的とする作用 (TNF- α ; 抗腫瘍効果) を分離し、医薬品としての有用性を引き出すことに成功した例は他にはない。ハイブリッド化によるサイトカインの作用分離は、1. 生体内安定性の向上に伴う投与量軽減によって、血中サイトカイン濃度が低下するため、多様なレセプターに対する親和性の相違に基づいた作用発現が可能になること、および、2. 体内挙動 (体内分布) が変化することによって組織移行性の相違に基づいた作用発現が可能になることなどによって達成できることが判明した。以上のことから、ハイブリッド化の目的や個々のサイトカインの諸性質に応じて最適の修飾高分子を選択し、さらにそのうえで、分子量-修飾率-活性の相関等の基礎的な情報を集積し、充分に主作用を発現出来得る最適条件を探求することで、臨床応用が期待できるハイブリッド化サイトカインが創製できる可能性が示された。

これまでのサイトカイン療法の最大の障壁は、体内安定性の乏しさと作用の多様性による、避けがたい副作用発現であったが、これら両問題を同時に解決できる手段の開発は、次世代のサイトカイン療法確立に大きく寄与するものと期待できる。さらにハイブリッド化は、不安定な種々のサイトカインの生理的濃度下における in vivo での機能解析や生理的意義の解明等、多くの生命科学の基礎研究においても多大の貢献をもたらすものと期待できる。

論文審査の結果の要旨

生理活性タンパク質を次世代の医薬品として開拓していくためには、生体内不安定性を克服できる DDS の開発が不可欠となる。

近年、DDS を視野においていた医薬品開発の分野において、生理活性タンパク質に水溶性高分子を結合させた、いわゆるハイブリッド化が考案されてきた。この水溶性高分子ハイブリッド化は、分子量増大による腎排泄速度の減少をもたらすだけでなく、ハイブリッド化に用いた修飾高分子によりタンパク質の分子表面が覆われるため、立体障害的にプロテアーゼからの攻撃がブロックされ、結果として生体内半減期の延長が実現される。この様なハイブリッド効果により、生理活性タンパク質の生体内安定性を改善できるため、ハイブリッド化により理想的な新薬が誕生するといわれている。

しかしこれまで、水溶性高分子ハイブリッド化の適用は、確固たる根拠もなく、低分子物質を基質とする酵素タンパク質などに限局されてきた。またハイブリッド化生理活性タンパク質の体内挙動は、タンパク質表面を覆う修飾高分子そのものの諸性質により著しく影響を受けてしまうにもかかわらず、修飾高分子自身に関する情報は皆無に等しかった。そのうえ、ハイブリッド化生理活性タンパク質の分子設計のための基礎概念 (in vitro 及び in vivo ハイブリッド化特性など) に至っては、全く不明であった。

この様な現状のもと、著者は TNF- α をモデル生理活性タンパク質として用い、水溶性高分子ハイブリッド化を試み、以下の結論を得た。

- 1) 水溶性高分子と細胞間の相互作用強度から、ハイブリッド化生理活性タンパク質の生体内挙動を推測しうる修飾高分子選択インデックスを構築した。
- 2) 低分子量物質を基質とする酵素タンパク質のハイブリッド化においては、その比活性が活性発限部位に結合した修飾高分子の数によってのみ、一義的に決定されることが明らかとなった。一方、活性発現に高分子レセプターとの結合を必要とする生理活性タンパク質のハイブリッド化においては、タンパク質に結合した修飾高分子による立体障害によっても、比活性低下を招いてしまうことが判明した。
- 3) 最適条件でハイブリッド化を行うことで、多様な in vivo 生理活性を有するサイトカインの作用分離及び生体内安定性の向上が可能になること、その結果飛躍的に治療効果が増強され、臨床応用への道が拓かれることが示唆された。
- 4) MPEG-TNF- α は、これまで全身投与では全く抗腫瘍効果が期待できなかった TNF- α 抵抗性の腫瘍株に対して、副作用を発現することなく劇的な治療効果を示すこと、さらに癌転移をも抑制できることが明らかとなった。MPEG-TNF- α は単独の全身投与で腫瘍の完全治癒を期待できることから、次世代の癌化学療法を担う新規抗癌剤となりうることが示唆された。

以上、ハイブリッド化の目的や個々の生理活性タンパク質の諸性質に応じて最適の修飾高分子を選択したうえで、さらに修飾率-分子量-活性相関や動態特性などの基礎的ハイブリッド化情報を集積し、充分に主作用を発現出来得る最適条件を探求することで、臨床応用を期待させるハイブリッド化タンパク性 DDS 製剤が創製できる可能性を示し、21世紀に向けたサイトカイン療法に重要な指針を与えている点、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものである。