The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	目的治療作用の選択的増強を目指した生理活性蛋白質のドラッグデリバリーシステムに関する研究
Author(s)	角田, 慎一
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155325
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【8】

氏　　名	角（つの）　田（だ）　慎（しん）　一（いち）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　14571　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学　位　論　文　名	**目的治療作用の選択的増強を目指した生理活性蛋白質のドラッグデリバリーシステムに関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　真弓　忠範 （副査） 教　授　小林　祐次　　教　授　松田　敏夫　　教　授　東　　純一

論文内容の要旨

近年の分子細胞生物学の目覚ましい進歩に伴い，鋭い作用を有する生体内微量生理活性蛋白質が次々と見出されてきている。また，バイオテクノロジーの進歩によって，生理活性蛋白質の大量生産が可能となってきたことも相俟って，各種生理活性蛋白質の医薬品化が期待されている。中でもサイトカインはその臨床的有用性から次世代医薬品として特に注目されている。しかしながら，サイトカインを実際に臨床応用する段になり，多くの問題が発覚してきたために，これまで，ごく一部のサイトカインが実用化されたにすぎず，多くはその効果を十分に発揮できぬまま取り残されているのが現状である。その主な原因は，第一にサイトカインの生体内安定性が極めて乏しいことにある。これは生体に投与されたサイトカインが各種タンパク分解酵素により，容易に分解されてしまうこと，さらに比較的低分子量のサイトカインは速やかに腎排泄されてしまうことなどに起因している。第二に，サイトカインは様々な組織，細胞に対して多様な生理作用を発揮しつつ，巧妙なサイトカインネットワークによって生体のホメオスタシスを維持しているため，人為的に大量のサイトカインを適用した場合，多くのサイトカインは目的とする治療作用と同時に不必要な他の作用までも発現させてしまうためである。そのため，現在のサイトカイン療法では，十分な治療効果を得るために生理的条件を逸脱した大量頻回投与を余儀なくされてしまう結果，必然的とも言える副作用発現のため，サイトカインの臨床応用は大きく制限されてしまっているのである。従って，バイオテクノロジー技術を駆使して今後も次々と大量生産されるであろう生理活性蛋白質に，有効性，安全性という医薬品的価値を付与していくためには，先に述べた2つの根本的問題点を克服する手段，すなわちサイトカインに生体内安定性付与していくことは勿論のこと，サイトカインの多様な生理作用の中から目的とする治療作用のみを選択的に引き出すことのできるDrug Delivery System（DDS）の開発が必要不可欠となってくる。

さて近年の抗癌剤・放射線による癌治療は，顕著な制癌効果を示すものの，重篤な副作用を伴うために，治療の中断を余儀なくされてしまい，必ずしも期待通りの臨床成果は得られていない。特に骨髄抑制による血小板減少症は主要な治療制限要因となっているうえ，これを改善できる薬物は未だ実用化されていないために，血小板増加作用を有する医薬品の開発が待望されている。近年インターロイキン6（IL-6）が血小板増加作用を有することが明らかとなり，その臨床応用が期待されている。しかしながら，IL-6も先に述べた問題点のため，現在その臨床応用は困難なものと考えられている。そこで我々は，IL-6をモデルサイトカインとして用い，高分子バイオコンジュゲーションにより臨床応用に適するサイトカインDDSの構築を試みた。バイオコンジュゲーションは，高分子をサイトカインに結

合させることによって，高分子化することで腎排泄を抑制するとともに，修飾高分子の形成する立体障害によってプロテアーゼからの攻撃を防ぐことなどによって，生体内安定性を高めることが可能となる。また修飾高分子の体内挙動特性をサイトカインに付与することでサイトカインの体内動態を制御し，*in vivo* 作用発現を制御することが可能になると考えられる。IL-6は骨髄静脈や肺血管内腔に多く存在する巨核球を刺激することで血小板産生を促進すること，また一方でIL-6の肝臓，脾臓をはじめとする全身組織中への移行は，副作用発現の要因となることから，IL-6に血中滞留性の増大を目的とした高分子バイオコンジュゲーションを適用することで，目的とする血小板産生作用を選択的に増強できるものと考えられる。そこで，安全性・汎用性が高く，これまでの研究で血中滞留性の向上に適することが判明しているポリエチレングリコール（PEG）を修飾高分子として用いて高分子バイオコンジュゲーションの有用性を評価した。

まず，最適なバイオコンジュゲート条件を見出すために，活性エステル法により合成したPEG化IL-6（PEG-IL-6）を種々の分子サイズに分画し，その効果を *in vivo* で検討したところ，MPEG-IL-6（平均分子量59kD）が最も血小板増加作用が顕著であり，未修飾体（Native IL-6）のわずか1／500量で同等の血小板増加作用を示すことが判明した。また，より高修飾率あるいは低修飾率のPEG-IL-6では血小板増加作用はMPEG-IL-6に比べ小さかった。すなわち，サイトカインの高分子バイオコンジュゲーションにおいては，至適バイオコンジュゲート条件を見出すことではじめて，*in vivo* 作用増強を達成しうることが明らかとなった。そこで次に，血小板増加以外の作用（副作用）への効果について検討した。IL-6は血小板増加作用以外に，脾臓B細胞に作用して抗体産生を促進し，また，肝細胞に作用して急性期反応（アルブミン産生の低下など）を誘導することが知られている。MPEG-IL-6のこれら副作用に対する効果を検討したところ，十分な血小板増加作用を示す投与量において，血中IgG1レベルの上昇，およびアルブミンレベルの低下度合はNative-IL-6に比べ大幅に軽減されていた。さらに，IL-6投与によって生じる発熱が臨床上大きな問題となっているが，MPEG-IL-6の発熱性試験を行った結果，MPEG-IL-6は発熱性を示さない投与量でも十分に血小板を増加させることが可能であった。以上の結果から，最適な条件でIL-6をPEGバイオコンジュゲーションすることにより，目的治療作用を選択的に増強できることが明らかとなった。

そこでPEGバイオコンジュゲーションによる血小板増加作用の選択的増強メカニズムを解明するために，PEG-IL-6とNative IL-6の体内動態を比較検討した。その結果，PEG-IL-6はNative-IL-6に比べ，肝臓，脾臓など，副作用発現組織への移行性が減少しており，血中滞留性が大幅に向上していた。さらにMPEG-IL-6の皮下投与後の血中滞留性が最も大きいことが判明した。以上の結果から，PEGバイオコンジュゲーションによりIL-6の血小板増加作用が選択的に増強された機構として以下のことが考えられた。まず，高分子バイオコンジュゲーションにより生体内安定性が向上したこと，さらに，最適条件（適した修飾高分子，最適な修飾率・分子サイズ）でバイオコンジュゲート化したMPEG-IL-6では，修飾率，分子サイズ，比活性の相関や安定性，組織移行性などの生体内諸因子との有機的バランスが最もすぐれていたこと，その結果，作用点である巨核球により選択的に作用したものと考えられた。

今後，さらに高分子バイオコンジュゲーションのシステムアップを図っていくためには，より多くの生理活性蛋白質について修飾率－分子サイズ－活性相関や各種生体内諸因子との関連の評価や，水溶液中でのバイオコンジュゲート化サイトカインの立体構造の把握，活性低下をきたさないような修飾部位制御法の開発等が必要とされる。さらに，サイトカインの種類に応じて，適切な体内挙動制御が可能なハイブリッド高分子の開発も必須となってくる。現在，PEGに代わって，より緻密な体内挙動制御が可能な機能性高分子や新規デバイスの開発を試みており，これらを統合することによって，よりインテリジェント化されたDDSが創製できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

バイオテクノロジーの進歩によって，生理活性蛋白質の大量生産が可能となり医薬品としての応用が期待されている。中でもサイトカインはその臨床的有用性から次世代医薬品として特に注目されている。しかしながら，サイトカインを実際に臨床応用する段になり，多くの問題が発覚してきた。その主な原因は，第一にサイトカインの生体内安定性が極めて乏しいことにある。第二に，サイトカインは様々な組織，細胞に対して多様な生理作用を発揮しつつ，

巧妙なサイトカインネットワークによって生体のホメオスタシスを維持しているため，人為的に大量のサイトカインを適用した場合，多くのサイトカインは目的とする治療作用と同時に不必要な他の作用までも発現させてしまうためである。従って，バイオテクノロジー技術を駆使して今後も次々と大量生産されるであろう生理活性蛋白質に，有効性，安全性という医薬品的価値を与えるためには，サイトカインに生体内安定性付与し多様な生理作用の中から目的とする治療作用のみを選択的に引き出すことのできる Drug Delivery System（DDS）の開発が必要不可欠である。そこで著者は高分子バイオコンジュゲーションによるサイトカインのドラッグデリバリーシステム構築に関する検討を行い，以下の結論を得た。IL-6をモデルに至適条件で PEG バイオコンジュゲート化することで，*in vivo* において血小板増加作用を500倍にも増強することに成功した。これは過去に報告されたあらゆる生理活性蛋白の作用増強の中で最大のものであった。その上，DMMAn を用いた新規高分子バイオコンジュゲーション法を開発し，元の IL-6 に比べ1500倍に増強する事に成功した。さらに，このバイオコンジュゲーション法を用いて IL-6の多様な *in vivo* 生理作用の中から他の作用を増強させずに目的とする血小板増加作用の治療作用をより選択的に増強し得ることを明らかにした。以上，高分子バイオコンジュゲーションにより目的とする治療作用に適した生体内挙動特性を付与することで，サイトカインの臨床的有用性を効率よく引き出しうることを明らかにした点，博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考える。