



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	<a href="https://doi.org/10.11501/3155325">https://doi.org/10.11501/3155325</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka



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

1999 年

角田 慎一

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

1999年

角田 慎一

# 目次

緒論	1
本論	5
第一章 Interleukin-6 の PEGylation による目的治療作用の選択的増強	5
第一節 PEG 化 IL-6 の創製と in vitro バイオコンジュゲート化特性の評価	6
第二節 PEG-IL-6 の血小板増加作用増強効果	11
第三節 PEG-IL-6 の副作用評価	16
第四節 PEG-IL-6 による血小板増加作用選択的増強メカニズム	18
第五節 血小板減少モデルマウスでの PEG-IL-6 の有効性評価	22
第六節 小括	24
第二章 より有効性の確保された高分子バイオコンジュゲート化サイトカイン を創製しうる新規バイオコンジュゲーション法の開発	27
第一節 DMMA <sub>n</sub> 法による PEG 化サイトカインの比活性改善効果	28
第二節 PEG-IL-6(+)による in vivo 治療効果の改善	32
第三節 小括	33
第三章 緻密な生体内動態制御と機能付与を目指した新規修飾高分子の開発	35
第一節 新規修飾高分子 PVP の合成とバイオコンジュゲート化特性の評価	36
第二節 PVP-IL-6 の in vivo 血小板増加作用増強効果	40
第三節 LIF の PVP バイオコンジュゲーション効果	41
第四節 小括	44
総括	46
結論	48
謝辞	49
引用文献	50



## 緒論

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(1-7)。また、これら生理活性蛋白質の過不足が往々にして種々の疾病や病態の形成および増悪化に関与することが明らかとされつつある(8,9)。そのため、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たことも相俟って、各種生理活性蛋白質の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ために、これまで顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)やエリスロポエチン(Erythropoietin; EPO)など、副作用が比較的軽度な一部のサイトカインが実用化されているにすぎない。え、医薬品化された一部のサイトカインについてさえ、インターフェロン- $\alpha$ (Interferon- $\alpha$ ; IFN- $\alpha$ )のように安全性の点で未だ致命的課題を残すものがあるなど、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(10,11)。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(12,13)。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(14,15)。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。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。しかしながら、この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と副作用の原因となるその他の作用とを分離し、目的治療作用のみを選択的に引き出すという“サイトカインへの作用の選択性付与”に関する研究は、薬物治療学の領域において重要かつ急務となる問題であるにも関わらず、未だ十分に検討が行われていないのが現状である。

近年、生理活性蛋白質に水溶性高分子を結合させる、いわゆる高分子バイオコンジュゲーションが考案されてきた(16-22)。この高分子バイオコンジュゲーションにより、生理活性蛋白質の見かけの分子サイズを増大させることにより腎排泄速度を低下させるとともに、生理活性蛋白質表面に結合した修飾高分子が形成する立体障害によりプロテアーゼからの攻撃を回避し得ることが期待される (Fig.1)。これらバイオコンジュゲート効果により、本来生体内で不安定な生理活性蛋白質の血中半減期の延長、および体内安定性の向上が達成される。これまでにアデノシン・デアミナーゼ (ADA)、スーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) など、主に低分子物質を基質とするような酵素蛋白質の高分子バイオコンジュゲーションが検討されてきた(16-19)。特に、ADA の血中半減期延長を目的としたポリエチレングリコール (PEG) コンジュゲート、

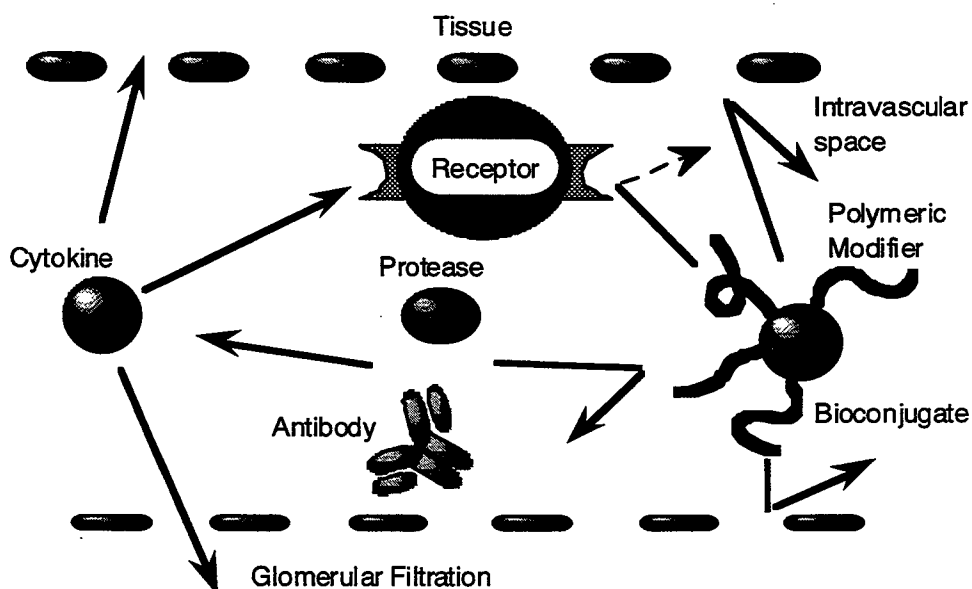


Fig.1 Purpose of bioconjugation of bioactive proteins

PEG-ADA は、ADA 欠損症の酵素補充療法として米国では既に臨床応用され、その有効性が認められている(23-25)。しかしながら、高分子バイオコンジュゲーションによる蛋白性医薬品の実用化は、これまでのところ酵素蛋白質に限局されているのが現状である。これは高分子バイオコンジュゲーションは、生理活性蛋白質の安定性を向上させる一方で、活性発現に高分子量のレセプターとの結合を必要とするサイトカインにおいては、修飾高分子による立体障害がレセプター結合をも阻害してしまい、比活性の大幅な低下を招いてしまうためである。以上のサイトカインのバイオコンジュゲーションにおける問題点を考慮したうえで、我々はこれまでに、モデルサイトカインとしての腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の高分子バイオコンジュゲーションを試みてきた(26-31)。その結果、比活性、修飾率、分子サイズ等の相関をつぶさに検討し、目的に応じた至適修飾条件を見出すことで、TNF- $\alpha$  の体内滞留性・安定性や腫瘍組織移行性を飛躍的に向上させ得ることを明らかにしてきた。さらに我々は、修飾高分子の有する物理化学的特性や官能基特性により、バイオコンジュゲート化生理活性蛋白質の生体内動態が大きく左右されること、即ちバイオコンジュゲーションに用いる修飾高分子による生理活性蛋白質の生体内挙動を任意にコントロールし得ることを示してきた(32,33)。以上の事実は、高分子バイオコンジュゲーションの本質的価値は、これまでの研究にみられるような生理活性蛋白質をはじめとする薬物の単なる体内安定化にのみあるのではなく、付加する修飾高分子の特性により、目的治療作用発現に適した生体内挙動特性を付与するとともに、副作用発現組織への移行を抑制することで、多様な生理作用を有するサイトカインの目的治療作用のみを選択的に引き出すという薬物（サイトカイン）への作用の選択性付与にあることを示している。しかしながら、この高分子バイオコンジュゲーションの潜在的有用性に着目し、サイトカインなどの薬物の生体内動態制御を行い、作用の選択的発現を目指そうとする研究は全く皆無である。そこで本研究では、血小板産生促進作用を有することで医薬品化が期待されているインターロイキン-6 をモデルサイトカインとして、高分子バイオコンジュゲーションにより、サイトカインの体内安定化を図るとともに、作用の点でのターゲティングとも言うべき目的治療作用の選択的増強を達成していくことを目指して、

1. 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目的治療作用選択的増強効果の検討

2. より有効性の確保された高分子バイオコンジュゲート化サイトカインを創製し得る新規コンジュゲーション法の開発

3. 緻密な体内挙動制御と機能付与を目指した新規修飾高分子の開発を行った。以上の研究により、有効性・安全性の確保された高分子バイオコンジュゲート化サイトカイン製剤の分子設計、および DDS 構築に関する有用な知見が得られたので、ここに博士論文としてまとめた次第である。



# 本論

## 第一章 Interleukin-6 の PEGylation による目的治療作用の選択的増強

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。特に骨髓抑制による血小板減少症は主要な治療中断・制限要因となっているうえ、これを改善できる医薬品は未だ開発されておらず、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 (Interleukin-6 ; IL-6) をはじめ、いくつかのサイトカイン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(34-40)。しかし、IL-6 などのサイトカインは血中滞留性に極めて乏しいため、十分な血小板増加効果を得るためには大量頻回投与を強いられ、逆に重篤な副作用を呈してしまっている(41,42)。そのうえ、これらサイトカインは、多様な *in vivo* 生理作用を有するために、生体に投与した際には目的とする治療作用以外の作用をも同時に招いてしまうなど、副作用制御の点で、現在その臨床応用は困難なものとなっている。従って、IL-6 などの血小板増加作用を有するサイトカインを次世代医薬品として創出していくためには、その体内安定性を改善するとともに、目的とする血小板増加作用とその他の作用を選択分離し、作用発現に選択性を付与し得る創薬テクノロジーの新規開拓が急務となってくる。

IL-6 は当初、B 細胞の増殖、分化を誘導する T 細胞因子、BSF-2 として単離されたサイトカインであるが(43)、後に他の生物活性を有する種々の因子と同一のものであることが明らかとなり、統一して IL-6 と呼ばれるようになった(44-52)。ヒト IL-6 は 183 アミノ酸からなる分子量 2 万の蛋白質であり、多彩な生物活性を有していることが明らかとされている。その主な作用は、B 細胞の抗体産生細胞への分化誘導(53)、T 細胞の活性化(54)、肝における急性期蛋白産生の誘導(55)、ケラチノサイトの増殖促進(56)、腎メサンギウム細胞の増殖(57)、造血幹細胞の分化促進(58)、巨核球刺激による血小板増加作用な

**Table I** Multiple actions of interleukin-6

---

induction of B-cell differentiation
acute phase proteins in liver cells
IL-2 and IL-2 receptor expression, proliferation and differentiation in T-cells
mesangial cell growth
neural differentiation of PC12 cells
keratinocyte growth
growth promotion of myeloma / plasmacytoma / hybridoma cells
inhibition of cell growth of certain myeloid leukemic cell lines
and their differentiation to macrophages
enhancement of IL-3-induced multipotential colony cell formation in hematopoietic stem cells
and induction of maturation of megakaryocytes as a thrombopoietic factor

---

どが報告されている (Table I) (34-37)。この中で臨床的に最も注目されているのが血小板産生促進作用である。IL-6 は巨核球上に発現する IL-6 レセプターを介して巨核球の分化増殖を刺激することで末梢血小板数を増加させることが知られている(59,60)。この血小板産生を担っている巨核球は、骨髓中のみならず、骨髓静脈血管表裏や肺血管内腔にも多く存在することが知られている(61)。巨核球が血小板を産生する場はいまだ完全には限局されていないが、現在のところ主として骨髓静脈や肺血管内腔で産生されることを裏付ける知見が多数報告されている(61-64)。従って、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、効率よく血小板産生を増強できるものと考えられる。一方で IL-6 の肝臓・脾臓をはじめとする全身組織への移行は、前述した他の多様な作用、すなわち副作用発現の要因となっていることも知られている(55,57,65)。従って、血管内局在化特性を IL-6 に付与することで、目的とする血小板増加作用とその他の作用とを選択分離し、効率よく目的作用を増強させ得ること、即ち IL-6 に作用の選択性を付与することで IL-6 の臨床応用上の問題点を克服し得るものと期待される。そこで本研究では、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って、臨床応用に適うサイトカイン製剤の分子設計を試みた。

## 第一節 PEG 化 IL-6 の創製と in vitro バイオコンジュゲート化特性の評価

ポリエチレングリコール (Polyethylene glycol ; PEG) は、抗原性、毒性が極めて小さいなど、日本薬局方に収載されている安全性の確立された合成高分子である(66)。さらに我々がこれまでに行った修飾高分子候補のスクリー

ニング実験の結果、陽電荷あるいは陰電荷を有する高分子は細胞膜との相互作用が顕著であるのに対し、非電荷である PEG は、細胞膜との相互作用がほとんどないこと、また、体内動態解析により、デキストランなどの糖鎖やポリスチレンマレイン酸などの疎水性の高い高分子は肝臓、脾臓などの細網内皮系に取り込まれ易い傾向にあるのに対し、PEG はそれらの組織にはほとんど取り込まれないことが判明している(26,32,33)。従って、血中滞留性向上を目的としたバイオコンジュゲーションに用いる修飾高分子として、PEG は非常に適しているものと考えられた。そこでまず、PEG を修飾高分子に用いて PEG 化 IL-6 (PEG-IL-6) を作製し、IL-6 の血中滞留性、血管内局在性の向上を試みた。さらに PEG の分子量、修飾率、分子サイズ、活性の相関を検討し、PEG バイオコンジュゲート化特性を評価した。

## 実験材料と方法

### PEG5K-IL-6 の合成

1.4mg/ml の recombinant human IL-6 (IL-6、中外製薬株式会社、東京、より供与) を含む PBS 溶液 (リン酸緩衝化生理食塩液、pH7.4) 500  $\mu$ l に、methoxypolyethylene glycol succinimidyl succinate (ssPEG、平均分子量 5,000、Sigma Chemicals Co., USA) 24mg (溶液中に含まれる IL-6 のリジンアミノ基に対して 10 倍モル当量) を加えて混合し、室温下、10 分間穏やかに攪拌させることで、IL-6 のリジンアミノ基に対して PEG バイオコンジュゲーションを行った。その後、0.3mg の  $\epsilon$ -aminocaproic acid (Sigma Chemicals Co., USA、ssPEG に対して 5 倍モル量) を添加することで反応を競合停止させた。反応後すみやかにゲルろ過 HPLC (カラム: Superose12、Amersham Pharmacia Biotech, Sweden、溶離液: 0.05M リン酸緩衝液、0.15M NaCl、pH7.2) により各種分子サイズに分画精製した。

### 平均分子量および高分子修飾率の算出

PEG の数平均分子量 ( $M_n$ ) は、ゲルろ過 HPLC (カラム ; TSKgel G4000PWxL、東ソー株式会社、東京) を用いて、標準 PEG (TSK 標準ポリエチレンオキサイド、東ソー株式会社、東京) による較正曲線から算出した。各フラクションの PEG-IL-6 の平均分子量には、蛋白質スタンダード (Gel

Filtration Calibration Kit、Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) による較正曲線から算出した数平均分子量を適用した。また、IL-6 分子中に存在する 14 個のリジン残基に対する PEG 結合数、および修飾率として、以下の式により算出される値を適用した。

PEG 結合数 = ((PEG-IL-6 の平均分子量) - 21,000) / (PEG の平均分子量)

修飾率(%) = 100 X (PEG 結合数) / 14

### PEG2K-IL-6、PEG12K-IL-6 の合成

PEG2K-IL-6、PEG12K-IL-6 の合成には平均分子量 2,000、および 12,000 の ssPEG (sunbright-20、sunbright-12M、日本油脂株式会社、東京、より供与) を用いた。反応方法は上記 PEG5K-IL-6 の合成法に準じた。

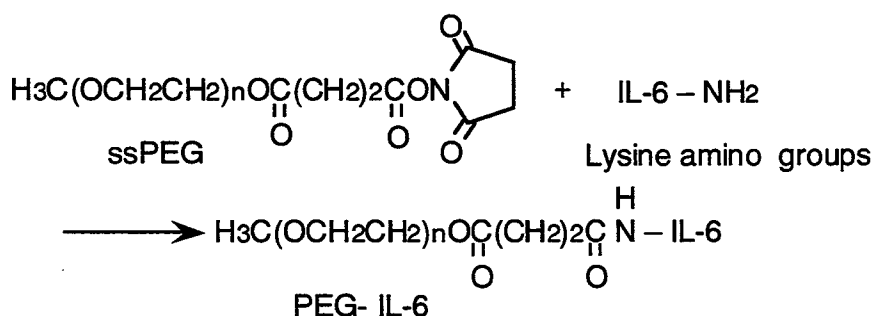
### PEG-IL-6 の In vitro 活性測定法

各 PEG-IL-6 の比活性は、Matsuda らの方法(67)に従い、IL-6 依存性増殖細胞であるマウスハイブリドーマ、MH-60 細胞を用いて測定した。MH-60 細胞は 200pg/ml の IL-6、及び 10%ウシ胎仔血清(FCS、Bocknec Laboratories Inc.、Canada) を含む RPMI-1640 培地で継代培養し、IL-6 を含まない培地で 3 回洗浄したのち実験に用いた。各 PEG-IL-6 を用いて、あらかじめ 10% FCS 含有 RPMI-1640 培地で段階希釈列を作製した 96 穴培養ディッシュに、 $5 \times 10^3$  個ずつ MH-60 細胞を播種した。37°C、72 時間培養後、MTT 法により細胞増殖を測定した。比活性(残存活性)は未反応 IL-6 (Native IL-6) の活性を 100 % として算出した。

### 結果および考察

活性発現に高分子レセプターとの結合を要するサイトカインにおける修飾高分子の鎖長と修飾率 (IL-6 への PEG 結合率)、分子サイズ (PEG 化 IL-6 の平均分子量)、比活性などの連関を追求し、最適バイオコンジュゲーション条件を見い出していくために、PEG-IL-6 の合成は、平均分子量 2,000、5,000、12,000 の PEG を修飾高分子に用いて行った。生理活性蛋白質に種々修飾高分子をバイオコンジュゲーションさせる方法、即ち生理活性蛋白質と修飾高分子との結合方法には、リジンアミノ基に対する活性エステル法(68)、塩化シアヌ

ル法(69)、カルボキシル基に対するカルボジイミド法(70)、また、チオール基に対するマレイミド法(71)などが知られている。カルボジイミド法はカルボキシル基とアミノ基の縮合反応であるため、蛋白質分子間および分子内架橋等の複雑な反応を避け得ないことがこれまでの我々の検討からも明らかとなっている。マレイミド法に関しては、一般に蛋白質中に遊離のチオール基は少なく、また、立体構造維持に関与する場合が多いために、チオール基の修飾は活性低下を招き易い。さらに IL-6 においては遊離のチオール基が存在しないため、IL-6 の PEG バイオコンジュゲーションにマレイミド法は選択し得ない。一方、リジンアミノ基を標的とした方法は、修飾高分子と蛋白質のリジン残基を選択的に反応させ得るうえ、上述の架橋反応を避け得るなどの利点を有している。そこで本研究においては、サイトカインという安定性に乏しい生理活性蛋白質を用いるという点をも考慮し、リジンアミノ基反応性の修飾方法のなかでも、最も反応条件が穏やかな（室温、中性条件下、30 分以内）活性エステル法を第一選択とした (Fig.2)。



**Fig2 Preparative scheme of PEG-IL-6**

rh-IL-6 is dissolved in PBS (pH7.4) and mixed with 10 molar excess of methoxypolyethylene glycol succinimidyl succinate (ssPEG) for 10 minutes at room temperature. Then  $\epsilon$ -aminocaproic acid was added and reaction was stopped. The reaction mixture was purified and separated by gel filtration HPLC into several fractions.

まず平均分子量 5,000 の片末端活性化 PEG を用いて IL-6 のバイオコンジュゲーションを試みたところ、分子量 2 万～9 万の PEG-IL-6 (PEG5K-IL-6) が得られた。修飾率-分子サイズ-活性の相関を見出す目的で、ゲルろ過 HPLC により種々の分子サイズに分画した (Table II)。MH-60 細胞を用いた in vitro 活性測定の結果、PEG-IL-6 の比活性（残存活性）は修飾率の増加に伴って減少することが判明した。IL-6 の Lys 171 はレセプター結合部位付近にあり、立体構造維持にも重要であることが明らかとなっていることから(72)、PEG バ

Table II Characterization of PEG5K-IL-6

Fraction	a) Mn	Degree of Modification (%)	b) No. of Modified Lys	c) Remaining Activity (%)
1	93,000	100	14.4	1.1
2	83,000	89	12.4	12.5
3	71,000	71	10.0	30.7
4	59,000	54	7.6	51.0
5	46,000	36	5.0	71.0
6	34,000	19	2.6	81.3
Native IL-6	21,000	0	0.0	100.0

PEG used this reaction was PEG5,000.

a) Average molecular weight ( Mn ) was determined by gel filtration HPLC ( protein standard ).

b) calculated from Mn

c) measured by growth assay using MH-60 cells

イオコンジュゲーションによる比活性低下の要因の一つとして、活性発現に関与するリジンアミノ基に対する PEG 結合が考えられた。平均分子量 2,000 および 12,000 の PEG を用いて作製した PEG-IL-6 (PEG2K-IL-6、PEG12K-IL-6) についても同様の検討を行った (Table III)。修飾高分子の鎖長 (分子量) と修飾率-比活性の相関を評価したところ、PEG の分子量が大きいほど、すなわち、修飾高分子の鎖長が長いほど修飾率の上昇に対する比活性低下の割合は著しいものであった (Fig.3)。以上の結果は、IL-6 の比活性が活性発現に関与する Lys171 への PEG 修飾だけでなく、IL-6 に結合している PEG 鎖のために生じる立体障害によっても損なわれてしまうことを示唆するものである。また TNF- $\alpha$  の PEG バイオコンジュゲーションにおいても同様に、鎖長の長い修飾高分子ほど顕著な比活性低下を示したことから、IL-6 などの活性発現に高分子レセプターとの結合を要する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、活性中心に位置するリジン残基の修飾だけではなく、修飾高分子の形成する立体障害も比活性低下の重要な要因となることが示された。即ち、サイトカインの高分子バイオコンジュゲーションは生体内安定化を達成し得る可能性を有する一方で、比活性の低下を招いてしまうという、両刃の剣となってしまうことが明らかとなった。



Table III Characterization of PEG-IL-6 using PEG2K and PEG12K

	Fr.	Mn <sup>a)</sup>	Degree of <sup>b)</sup> Modification (%)	Remaining <sup>c)</sup> Activity (%)
PEG2,000-IL-6	1	45,000	86	37.0
	2	36,000	54	74.4
	3	27,000	21	85.5
PEG12,000-IL-6	1	107,000	51	4.0
	2	89,000	40	10.8
	3	72,000	30	35.1
	4	54,000	20	64.9
	5	37,000	10	88.5
Native-IL-6		21,000	0	100.0

a) : Average molecular weight ( Mn ) was determined by GF-HPLC ( protein standard ).

b) : calculated from Mn c) : measured by growth assay of MH-60 cells

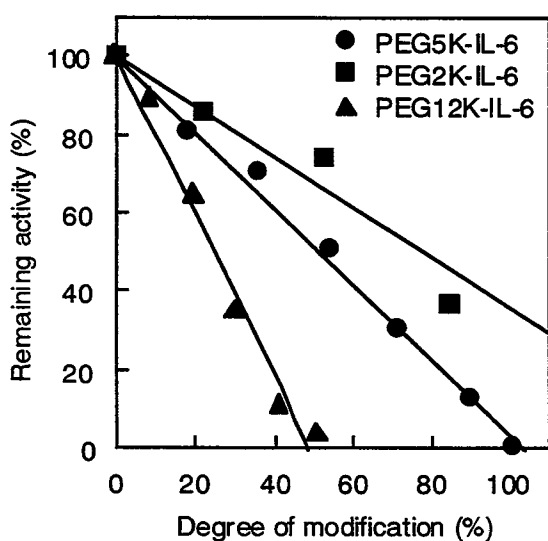


Fig3 Relationship between degree of modification and remaining activity of PEG-IL-6

The data in Table II and Table III were plotted.

## 第二節 PEG-IL-6 の血小板増加作用増強効果

前節では PEG-IL-6 の PEG バイオコンジュゲート特性を in vitro で評価した。そこで次に、in vivo で各 PEG-IL-6 の血小板増加作用を比較した。

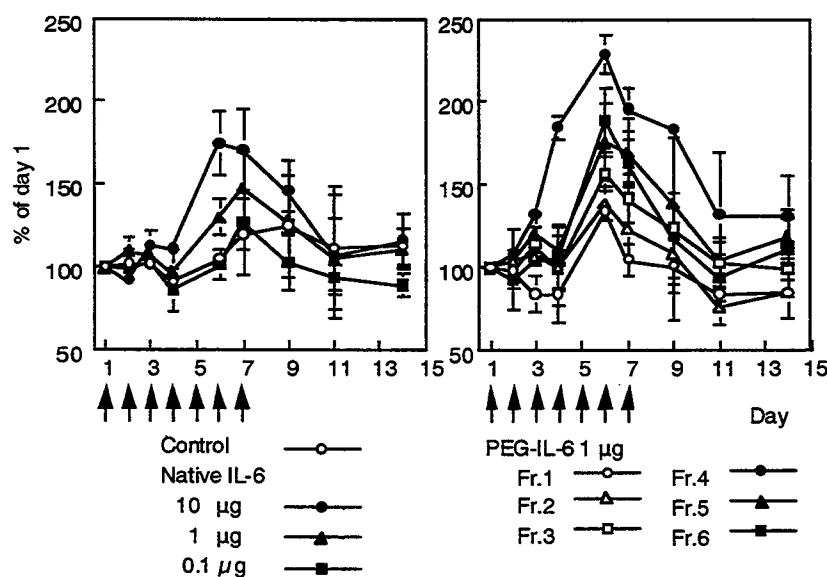
### 実験材料と方法

PEG-IL-6 の in vivo 血小板増加作用は、Native IL-6 または PEG-IL-6 を C3H マウス (雄、5 週齢、日本 SLC 株式会社、静岡) 背部皮下に投与後、

経日的に尾静脈より採血し、自動血球測定装置 (F-820、東亜医用電子株式会社、兵庫) により血小板数を測定することで評価した。各投与サンプルは、キャリアーとして 0.05% 牛血清アルブミン (BSA、グロブリン不含、和光純薬工業株式会社、大阪) 含有生理食塩液で  $200\mu\text{l}/\text{mouse}$  となるよう調整した。Control 群には  $10\mu\text{g}$  の PEG を投与した。

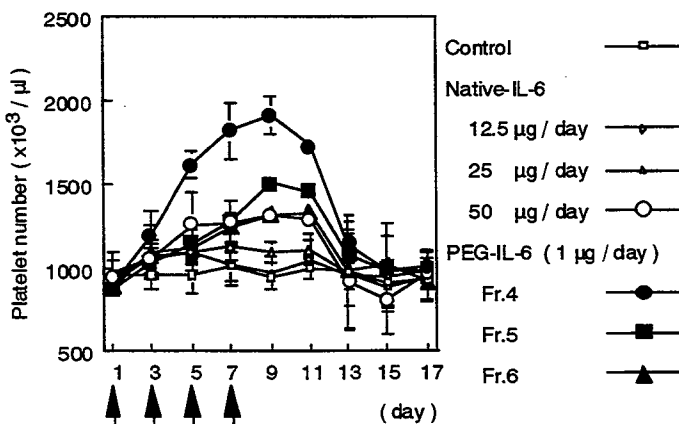
### 結果および考察

造血系サイトカインの作用発現には、一般に標的細胞への持続的刺激が必要となるため、これらサイトカインの投与方法としては皮下投与、あるいは点滴静注を適用する場合は殆どである(73,74)。従って生体内安定性の向上が期待し得る PEG-IL-6 についても、皮下投与で検討を行った。まず、PEG5K-IL-6 について、スクリーニングの意味合いで Native IL-6 あるいは種々の分子サイズ (平均分子量) の PEG5K-IL-6 (高分子量のものから順に Fraction.1~6 と名付けた。Table I を参照) を連日 7 日間皮下投与し、末梢血小板数を測定した (Fig.4)。Native IL-6 投与群では、投与開始 4 日目までは何ら末梢血小板数の増加は認められなかったが、6 日目以降にようやく投与量依存的な血小板数の増大が観察された。また  $10\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$  の Native IL-6 を投与することで、投与において最終投与日付近 (投与後 6、7 日目) で約 70% の増加を示した。各 PEG5K-IL-6 の中で、Fraction.4 (Fr.4、平均分子量 59,000、修飾率 54%) の効果が最も大きく、投与開始 3 日目から速やかに末梢血小板数が

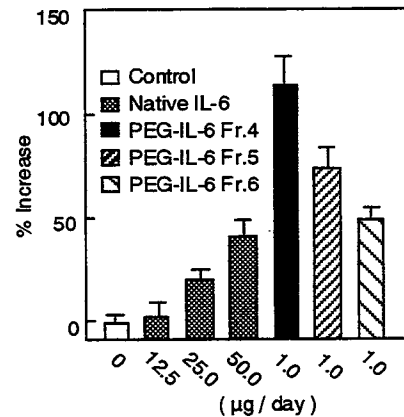


**Fig.4 Peripheral platelet level after s.c. injection of PEG5K-IL-6**  
Native IL-6 or PEG-IL-6 were diluted in saline containing 0.05% BSA and injected subcutaneously everyday for 1 week. Control mice were given  $10\mu\text{g}$  of PEG. Blood was taken from tail vein and platelet number was measured by auto platelet counter. Data represented as % of platelet number of day 1. (n=5, mean $\pm$ SD)

増加し始め、IL-6 量として僅か  $1\mu\text{g/day/mouse}$  の投与で最大 2.3 倍に増加した。即ち PEG5K-IL-6 Fr.4 は、Native IL-6 の 10 倍以上にも目的とする血小板増加作用を有することが判明した。また、Fr.4 よりも高分子量 (Fr.1~3) あるいは低分子量 (Fr.5、6) の PEG5K-IL-6 では、Native IL-6 と比較してその血小板増加作用は同程度 (Fr.1~3) から 10 倍未満 (Fr.5、6) であり、その作用増強効果は Fr.4 よりも乏しいことが明らかとなった。即ち IL-6 の PEG バイオコンジュゲーションにおいては、その血小板増加作用を効率よく増強させ得る至適コンジュゲート条件が存在することが示唆された。このメカニズムについては、薬物動態学的解析等により後の節において説明を試みた。そこで次に、血小板増加作用の大きかった PEG5K-IL-6 Fr.4、5、6 について、投与間隔を削減することで、その有用性を評価した。



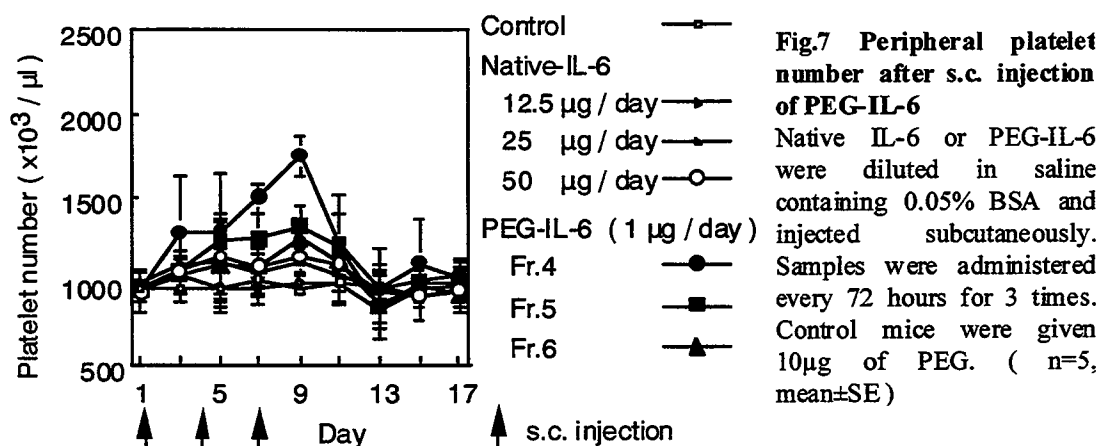
**Fig.5 Peripheral platelet level after s.c. injection of PEG5K-IL-6**  
Native IL-6 or PEG-IL-6 was diluted in saline containing 0.05% BSA and injected subcutaneously. Samples were administered every 48 hours for a week. Control mice were given 10μg of PEG. (n=5, mean±SE)



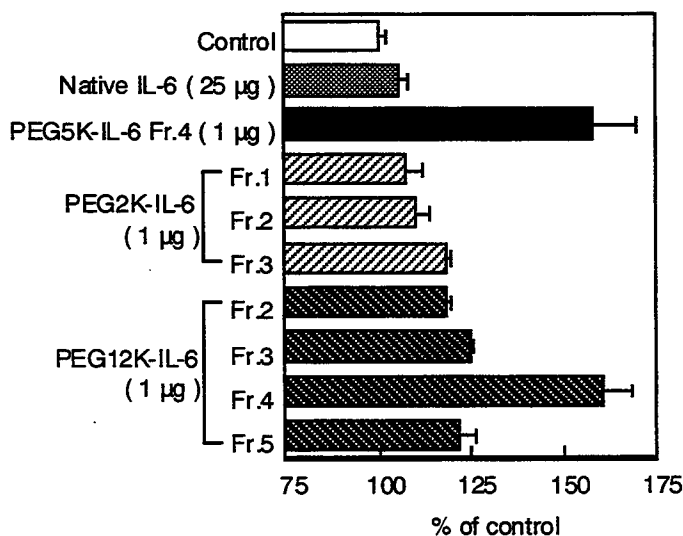
**Fig.6 Peripheral platelet level after s.c. injection of PEG5K-IL-6 on day9**  
Native IL-6 or PEG-IL-6 was injected subcutaneously. Samples were administered every 48 hours for a week. Control mice were given 10μg of PEG. The % increase of platelet number on day9 was represented.

2日に1回、計4回投与において、Native IL-6  $50\mu\text{g/day/mouse}$  の投与によっても、投与開始9日目によりやく最大 40%の血小板数増加を示すにすぎなかった (Fig.5、Fig.6)。一方、PEG5K-IL-6 Fr.4 においては、投与開始3日目ですでに約 40%の末梢血小板数の増大が認められ、血小板数は day9 で最大値を示し、わずか  $1\mu\text{g/day/mouse}$  の投与で血小板数は最大 2.1 倍にも増加した。即ち PEG5K-IL-6 Fr.4 は、Native IL-6 と比較して、1/50 以下のというより低用量で、より早く、より強く、目的作用を発揮し得るものと考えられた。PEG5K-IL-6 Fr.5、Fr.6 においても Native IL-6 に比べ血小板造作

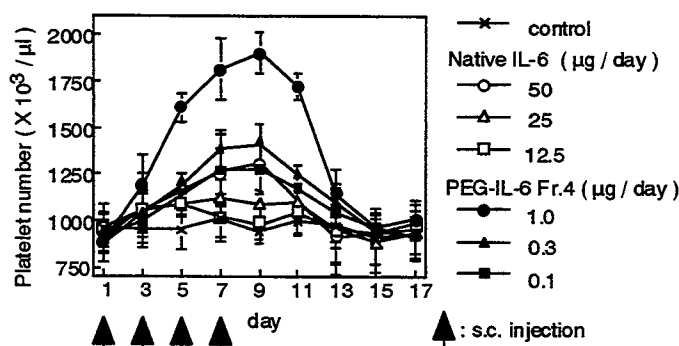
用の増強効果は観察されたが、その増強率は PEG5K-IL-6 Fr.4 よりも低率であった。さらに、PEG5K-IL-6 Fr.4 は3日に1回、計3回の投与においても、 $1\text{ }\mu\text{g/day/mouse}$  の投与で 1.9 倍もの目的とする血小板増加作用を示した (Fig.7)。



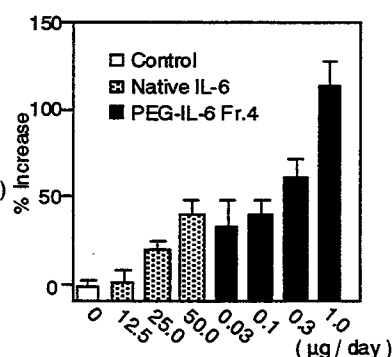
一方、PEG2K-IL-6、PEG12K-IL-6 についても同様に血小板増加作用を評価した結果、PEG の分子量が小さいために平均分子量 45,000 のものまでしか作製できなかった PEG2K-IL-6 では顕著な作用増強は認められなかった (Fig.8)。一方、PEG12K-IL-6 においては平均分子量 54,000 の PEG5K-IL-6 Fr.4 が PEG5K-IL-6 Fr.4 と同程度の血小板増加作用を示したものの、他の Fraction では顕著な血小板増強作用を有するものは得られなかった。



そこで、最も高い血小板増加作用を示した PEG5K-IL-6 Fr.4 について、さらに投与量を減少させて検討を行った (Fig.9、Fig.10)。最大血小板数を示した day9 で比較すると、PEG5K-IL-6 Fr.4 においては、わずか  $0.1 \mu\text{g} / \text{day} / \text{mouse}$  の投与でも、Native IL-6  $50 \mu\text{g} / \text{day} / \text{mouse}$  と同程度の血小板増加作用を有していることが判明した。すなわち、PEG5K-IL-6 Fr.4 は Native IL-6 に比べ 500 倍もの血小板増加作用を発揮することが明らかとなった。この 500 倍という目的作用増強効果は、種々生理活性蛋白質に対して過去に行われてきた、あらゆる高分子バイオコンジュゲーションによる作用増強効果と比べても最大のものである。



**Fig.9** Peripheral platelet number after s.c. injection of PEG5K-IL-6. Native IL-6 or PEG5K-IL-6 fraction.4 was diluted in saline containing 0.025% BSA and injected subcutaneously to C3H mice. Samples were administered every 48 hours for a week. Control mice were given  $10 \mu\text{g}$  of PEG. (n=5, mean $\pm$ SE)



**Fig.10** Dose-response effects of PEG5K-IL-6 on platelet production. Native IL-6 or PEG5K-IL-6 was administered every 48 hours for 4 times. Increase of platelet number on day 9 were indicated. (n=5, Mean $\pm$ SE)

以上の結果より、IL-6 の血小板増加作用の効率的増強を行い得る至適コンジュゲート条件の存在が明らかとなった。本実験において、PEG を修飾高分子に用いて IL-6 のバイオコンジュゲーションを行った場合、平均分子量 5~6 万程度のバイオコンジュゲート体に分子設計することが血小板増加作用を効率的に増強させ得る一つの条件であることが示唆された。また、修飾高分子の分子量としては、検討した範囲においては、平均分子量 5,000 の PEG が最も適していることが示唆された。すなわち、IL-6 の血小板増加作用を効率よく増強するためには、ただ単に高分子を結合させればよいのではなく、修飾高分子の分子量や修飾率-分子サイズ-活性の相関を詳細に検討し、至適条件を充たすバイオコンジュゲート体を分子設計していくことが重要であると考えられた。

### 第三節 PEG-IL-6 の副作用評価

これまでの検討から、最適条件での PEG バイオコンジュゲーションにより、IL-6 の目的治療作用である血小板増加作用を飛躍的に増強し得ることが判明したが、IL-6 をはじめとする多くのサイトカイン製剤の問題点である、多様な作用を有することに起因する副作用発現をも同時に増強されていたのでは全く意味をなさない。すなわち、IL-6 を高分子バイオコンジュゲーションする価値は、IL-6 の血中滞留性向上と全身組織への分布抑制という体内動態制御により、血管内巨核球を標的とした血小板産生作用と、少なくとも血管外組織において引き起こされる副作用発現とを分離し、IL-6 の目的治療作用のみを増強し、IL-6 の医薬品としての有用性を引き出すことにある。そこで次に PEG-IL-6 の目的治療作用と副作用の発現強度の比較を試みた。

#### 実験材料と方法

##### 血清アルブミン濃度の測定

第一章第二節で行った 2 日に 1 回、計 4 回投与の実験において採血した末梢血血清分画を用いた。アルブミン濃度はブロムクレゾールグリーン法によるアルブミン測定キット（アルブミン B-テストワコー、和光純薬工業株式会社、大阪）を用いて測定した。

##### 血清 IgG1 濃度の測定

血清 IgG1 濃度の測定は Enzyme Linked Immuno Solvent Assay (ELISA) により測定した。96 穴 ELISA プレートにウサギ抗マウス IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch、USA) を固相化し、2 時間ブロッキングを行った (ブロックエース、大日本製薬株式会社、大阪)。適宜希釈した血漿サンプル、および標準マウス IgG1 (Chemicon International Inc.、USA) を添加し、2 時間後洗浄した。Horse Raddish Peroxidase (HRP) 標識ウサギ抗マウス IgG1 抗体 (Zymed Laboratories Inc.、USA) を加え、2 時間後洗浄し、基質溶液 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine、TMBZ) を加えて発色を行った。吸光度 (測定波長 450nm、対照波長 655nm) をマイクロプレートリーダー (Model 3550、BioRad Laboratories, Co., Ltd.、USA) で測定した。その他の方法は常法に



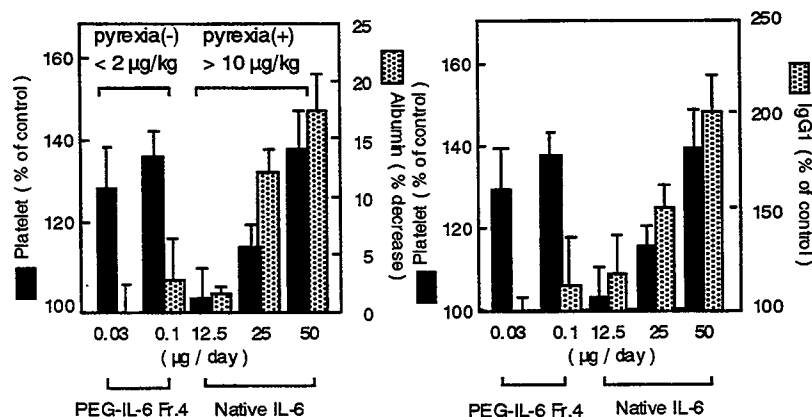
より行った。

## 発熱性試験

発熱性試験は日本薬局方発熱性物質試験法に準じた。

## 結果および考察

IL-6 の目的とする血小板増加作用以外の、副作用の原因となり得るその他の作用としては、肝実質細胞で起こる急性期反応（アルブミン産生の低下、CRP 産生亢進、フィブリノーゲン産生の亢進など）(55,75)、脾細胞に対する作用を中心としたイムノグロブリンIgG1産生の亢進(76)などが知られている。また臨床上、発熱などの副作用も大きな問題となっている(77,78)。これらは各組織細胞での IL-6 レセプターを介した作用であることが知られている。そこで、血中アルブミンレベル、および IgG1 レベル、さらに発熱性を副作用の指標として評価した。Native IL-6 においては、極僅かな血小板増加しか示さなかった 25  $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$  の投与においても、顕著なアルブミン減少を示し、50  $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$  の投与では約 20%もの減少を示した(Fig.11)。また、Native IL-6 25  $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$  の投与により IgG1 レベルは 1.5 倍に上昇し、さらに、50  $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$  の投与では 2 倍にも達した。従ってこれまでの報告通り、Native IL-6 では十分な治療効果（血小板増加効果）を得るためには、その他の作用の発現をも免れ得ないことが確認された。一方 PEG5K-IL-6 Fr.4 においては、0.1  $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$  の投与で Native IL-6 50  $\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$  の投与と同程度の血小板増加作用を示すなど、目的とする治療作用が 500 倍にも増強されている一方で、この十分な血小板増加作用を発揮する 0.1  $\mu$



**Fig.11 Serum albumin and IgG1 level on day 9 after s.c. injection of PEG-IL-6**

Serum albumin concentration was measured by albumin assay kit (left). Blood samples of mice on day 9 after every 2 days injection were used. Serum IgG1 concentration was measured by ELISA (Right). Blood samples on day 9 after every 2 days injection were used. Pyrexia was assessed by pyrogen test with rabbits. (n = 5, mean  $\pm$  SE)

g/ day/ mouse の投与でもアルブミン減少や IgG1 レベルの上昇はほとんど生じなかった。すなわち PEG5K-IL-6 Fr.4 では、血管外組織である肝細胞・脾細胞に対する作用増強強度に比べ、血管内に存在する巨核球での血小板増加作用がより効率よく増強されていることが判明した。また、ウサギを用いた発熱性試験の結果、Native IL-6 では  $10\mu\text{g}/\text{kg}$  以上の投与で発熱性も示したことから、わずかな血小板増加しか示さない  $12.5\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$  の投与でも発熱性を示すことが明らかとなった。一方 PEG-IL-6 Fr.4 では  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  以下では発熱性を示さなかったことから、十分に血小板産生が期待できる投与量 ( $0.1$ 、 $0.03\mu\text{g}/\text{day}/\text{mouse}$ ) でも発熱をほとんど伴わないことが示唆された。以上の結果より、PEG を用いた至適バイオコンジュゲーションにより、IL-6 の目的とする血小板増加作用と他の作用とを分離し、目的作用のみを効率よく増強し得ることが明らかとなった。

#### 第四節 PEG-IL-6 による血小板増加作用選択的増強メカニズム

前節までで IL-6 に PEG バイオコンジュゲーションを行うことで、目的治療作用を選択的に増強し得ることが明らかとなったが、これがストラテジー通り、IL-6 の安定化、血管内滞留性の向上、副作用発現組織への移行性低下に因るのかどうか、また、最適のハイブリッド条件の要因を明らかとする目的で PEG-IL-6 の薬物動態学的解析を行った。

#### 実験材料と方法

##### プロテアーゼ抵抗性の評価

蛋白量として  $105\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $5 \times 10^3\mu\text{mol}/\text{ml}$ ) となるように Native-IL-6 および PEG-IL-6 を PBS で希釈し、各々  $100\mu\text{l}$  にプロテアーゼ溶液として、trypsin (trypsin 1:250、Difco Laboratories、USA)、chymotrypsin ( $\alpha$ -chymotrypsin、和光純薬工業株式会社、大阪)、papain (papain 1:350、和光純薬工業株式会社、大阪) を IL-6 に対して 10 倍 mol 量ずつ加えた。37°C でインキュベートし、経時的にサンプリングを行い、10% FCS 含有 RPMI1640 培地で IL-6 量として  $1\text{ng}/\text{ml}$  となるように希釈・中和した。各サンプルの残存活性を MH60 細胞による活性測定法（第一章第二節）により測定した。

### PEG5K-IL-6 の $^{125}\text{I}$ ラベル化

PEG5K-IL-6 (Fr.2、Fr.4、Fr.6) の  $^{125}\text{I}$  ラベル化は lactoperoxidase 法 (79)により行った。Native IL-6 および PEG5K-IL-6 は蛋白濃度  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように  $0.1\text{M}$  リン酸緩衝液 (pH 7.2) で希釈し、この溶液  $25\mu\text{l}$  に  $100\text{mCi}/\text{ml}$  の  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (NEN Life Science Products Inc.、USA)  $10\mu\text{l}$ 、Enzymobead (BioRad Laboratories、USA)  $50\mu\text{l}$  を混合した。 $1\%$   $\beta$ -D-glucose 水溶液  $25\mu\text{l}$  を加えることにより反応を開始し、室温下、30 分間反応させた。ただちに反応液を  $0.2\%$  BSA を含む PBS 溶液で平衡化させた脱塩カラム (PD-10、Amersham Pharmacia Biotech、Sweden) により精製した。比放射活性は Native IL-6、PEG5K-IL-6 共に  $500\text{kBq}/\mu\text{g}$  であった。なお、ラベル化による IL-6 の活性低下は認められなかった。

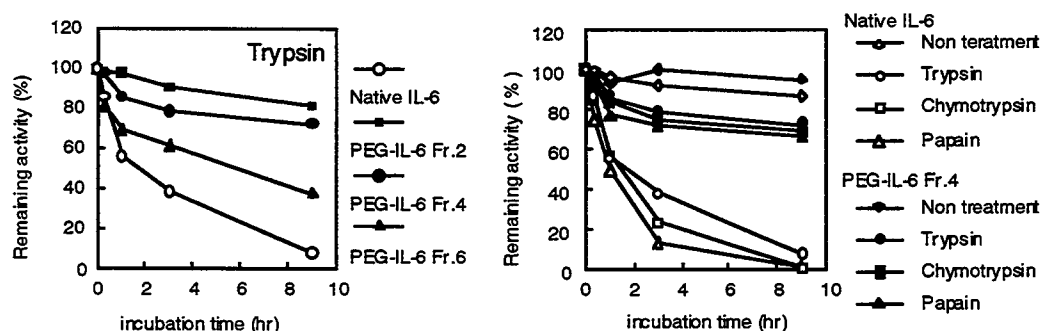
### PEG5K-IL-6 の生体内挙動の検討

PEG5K-IL-6 の生体内動態の検討は、 $^{125}\text{I}$ -Native-IL-6、 $^{125}\text{I}$ -PEG-IL-6 を  $1 \times 10^6\text{ cpm}/200\mu\text{l}$  ( $40\text{ng}/200\mu\text{l}$ ) となるように生理食塩液で希釈し、C3H マウス (雄、5 週令、日本 SLC 株式会社、静岡) に尾静脈、あるいは  $3.3 \times 10^6\text{ cpm}/200\mu\text{l}$  ( $120\text{ng}/200\mu\text{l}$ ) を背部皮下に投与することによって行った。血中濃度の測定は、経時的に尾静脈より採血することにより行った。組織分布の検討は、静脈内投与 3 時間後に pentobarbital sodium (Nembutal Injection、ダイナボット株式会社、大阪) により深麻酔し、腹部大動脈切断により脱血後、各臓器を摘出した。各サンプルの放射活性は、自動ガンマカウンター (COBRA II、Packard Instrument Company、USA) により測定した。薬物速度論的パラメータは 2-コンパートメントモデルまたは 1-コンパートメントモデルに基づき、非線形最小二乗法によって算出した。

### 結果および考察

PEG バイオコンジュゲーションは、生理活性蛋白質に結合した修飾高分子が形成する立体障害により、プロテアーゼからの攻撃を回避し、その結果生理活性蛋白質の血中での安定性を増大し得るものと期待される。そこでまず、in vitro で高分子バイオコンジュゲーションによるプロテアーゼ抵抗性に対する影響を評価した。Native IL-6 はすみやかに trypsin 処理によって失活したの

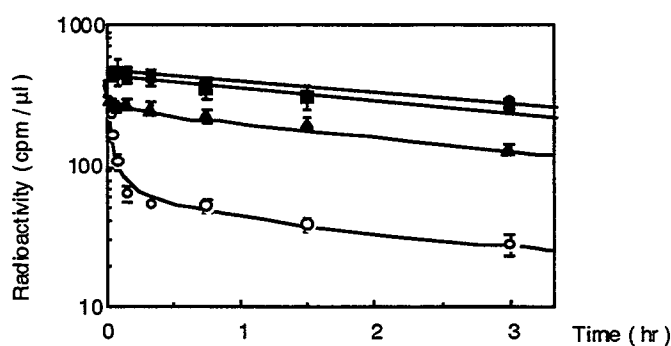
に対し、PEG5K-IL-6 では修飾率の増大に伴って抵抗性が著しく増大し、9 時間の処理によっても PEG5K-IL-6 Fr.2、Fr.4 は 80 %の活性を保持していた (Fig.12)。in vivo で最も血小板増加作用の大きかった PEG-IL-6 Fr.4 について、切断認識部位の異なる他のプロテアーゼについての抵抗性も検討したところ、chymotrypsin、papain に対しても同様に抵抗性を示した。従って、PEG-IL-6 の効果増強機序の一因として、プロテアーゼによる分解を防ぎ、血中での安定性が向上したものと考えられた。



**Fig.12 Resistance of PEG-IL-6 Fr.4 to various proteases**

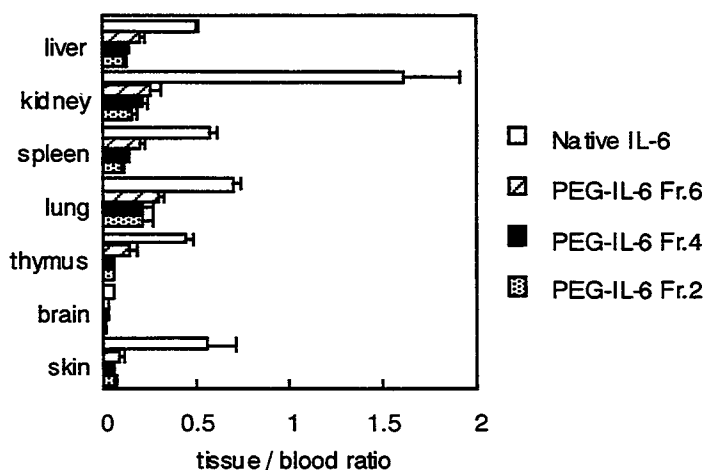
Native IL-6 and PEG-IL-6 were incubated with trypsin, chymotrypsin and papain for indicated times. Reaction mixtures were diluted and neutralized by RPMI1640 medium containing 10% FCS. Then remaining activity of these samples were measured by the assay using MH60 cells.

次に PEG5K-IL-6 の生体内挙動を検討した。Native IL-6 は静注後投与半減期 2 分ですみやかに血中から消失した (Fig.13)。この Native IL-6 の半減期は他の研究者らの報告とほぼ一致していた。一方 PEG5K-IL-6 は修飾率、分子サイズが大ききもののほど血中滞留性が高く、投与半減期は PEG5K-IL-6 Fr.4 で 200 分にまで延長され、血中半減期は Native IL-6 の 100 倍に、その全身クリアランスは 1/5~1/10 にまで減少していた。また、Native IL-6 は二相性の消失パターンを示したが、PEG-IL-6 では一相性の消失を示したことから、PEG-IL-6 では血管内から組織への移行性が抑制されているものと解析された。また投与 3 時間後の各組織への移行性を評価した結果 (Fig.14)、肝臓、脾臓をはじめとする各組織への移行性が PEG 化により抑制されていることが明らかとなった。次に実際の投与経路である皮下投与後の体内挙動を検討したところ、Native IL-6 の血中濃度は低く、12 時間後ではほぼ消失したのに対し、PEG5K-IL-6 では最高血中濃度、滞留時間共に大幅な増大が認められた (Fig.15)。薬物濃度下面積 (AUC)、最高血中濃度 (Cmax) は PEG5K-IL-6 の中で Fr.4 が最も大きかった。これは PEG-IL-6 Fr.4 の投与部位での安定



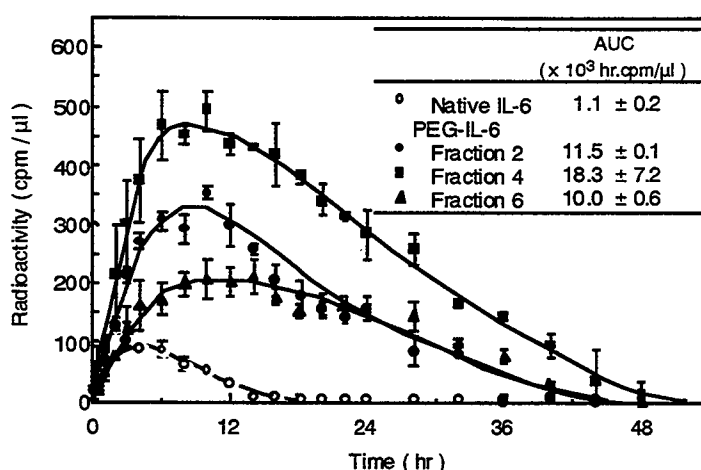
	$t_{1/2}$ (min)	$CL_{total}$ (ml/hr)
○ Native IL-6	$2.07 \pm 0.47$	$4.00 \pm 0.26$
● PEG-IL-6 Fr.2	$242 \pm 53$	$0.40 \pm 0.08$
■ PEG-IL-6 Fr.4	$206 \pm 38$	$0.46 \pm 0.05$
▲ PEG-IL-6 Fr.6	$170 \pm 6$	$0.87 \pm 0.05$

**Fig.13 Pharmacokinetic profile of PEG-IL-6 after i.v. injection**  
 $[^{125}\text{I}]$ -Native-IL-6 or  $[^{125}\text{I}]$ -PEG-IL-6 ( $1 \times 10^6$  cpm/40 ng protein) was administered by i.v. injection. Blood samples were taken at indicated times and measured their radioactivity by auto- $\gamma$ -counter. Pharmacokinetic parameters were calculated with one-compartment model (PEG-IL-6) or two-compartment model (Native-IL-6). ( $n = 3$  or 4, mean  $\pm$  SD)



**Fig.14 Tissue distribution of PEG-IL-6 3 hours after i.v. injection**  
 Each organ was removed 3 hours after i.v. injection of PEG-IL-6 and radioactivity was counted. Data represented as tissue-blood ratio (cpm of mg tissue / cpm of mg blood). ( $n=3$  or 4, mean  $\pm$  SD)

性、皮下組織から血中への移行・吸収性、血中での安定性と血中滞留性、および血中から組織への移行性や腎排泄などのバランスが最も優れていたためであると推測される。従って今後、上記バランスを決定する一つ一つの要因をつぶさに検討していく必要がある。例えば高分子化合物の組織から血中への移行・吸収過程には、一般に直接的な組織からの血中移行のみならず、リンパ系を介した血中移行なども考えられるため、より詳細な動態評価による速度論的解析が必要であると考えられる。また、本体内動態の検討においては、各フラクションの違いにより体内動態にどのような差違が生じるのかを明らかにするために、標識薬物の投与量をできるだけ少なくし、レセプター飽和等の影響が小さくなるように実験を行った。従って、より詳細に解析を行うためには、投与量を変化させた場合の動態（投与量—体内動態—効果の相関）などの検討も必要である。



**Fig.15 Pharmacokinetics of PEG-IL-6 after s.c. injection**

[ $^{125}$ I]-Native-IL-6 or [ $^{125}$ I]-PEG-IL-6 ( $3.3 \times 10^6$  cpm/120ng protein) was administered by s.c. injection. Blood samples were taken at indicated times and measured their radioactivity by auto- $\gamma$ -counter. Pharmacokinetic parameters were calculated with one-compartment model. (n = 3 or 4, Mean  $\pm$  SD)

以上の結果より、PEG5K-IL-6 Fr.4 は、比活性や血管局在性などの上述の有機的バランスに最も優れていた結果、最も高い血小板増加作用を示したものと考えられる。即ち、IL-6 の作用メカニズムを考慮した最適条件で、PEG バイオコンジュゲーションすることで、立体障害形成によるプロテアーゼ抵抗性の付与、高分子化による腎排泄速度の低下、組織分布の抑制などにより IL-6 の血中滞留性を大幅に向上させ得ること、このバイオコンジュゲート効果により目的とする血小板産生作用の選択的増強と副作用の軽減が達成されることが示唆された。

## 第五節 血小板減少モデルマウスでの PEG-IL-6 の有効性評価

さて、現在の癌治療において、化学療法や放射線療法は顕著な制癌効果を示すものの、同時に重篤な副作用を招いている。中でも血小板減少症は主要な治療中断・制限要因となっている。血小板減少症は出血傾向など、致命的な病態につながることから、これを予防、あるいはすみやかに回復させる手段、薬物の開発が待望されている。さて、前節までの結果より、PEG5K-IL-6 Fr.4 が顕著な血小板増加作用を発揮することが示されたが、これまでは正常マウスでの検討であった。そこで、病態モデルマウスを用いて PEG5K-IL-6 Fr.4 の臨床的有效性を評価した。



## 実験材料と方法

### 血小板減少モデルマウスの作製

血小板減少モデルマウスの作製は Takatsuki らの方法(80)に従った。C3H マウス (雄、5 週齢、日本 SLC 株式会社、静岡) の腹腔に、5-fluorourasil (5-FU、和光純薬工業株式会社、大阪) の PBS 溶液を 150mg/kg 単回投与することで病態モデルを作製した。

### 血小板増加作用の評価

day1 に 5-FU を投与し、同じく day1 から Native IL-6 あるいは PEG5K-IL-6 Fr.4 を 2 日に 1 回、計 4 回皮下投与し、経日的に血小板数を測定した。

## 結果および考察

5-FU をはじめとする抗癌剤のほとんど全てが骨髄抑制による血小板減少、貧血などの致命的副作用を発現してしまうことが明らかとなっている。Takatsuki らは、5-FU 投与により血小板減少を発症させたマウスに native IL-6 を投与し、血小板数の回復効果を検討しているが、顕著な効果は認められていない(80)。そこで PEG-IL-6 Fr.4 の、5-FU 投与マウスにおける血小板数回復促進効果について検討した (Table IV)。

Table IV Effect of PEG-IL-6 on platelet recovery in mice treated with 5FU

Group	Dose ( $\mu\text{g} / \text{day}$ )	Platelet number ( $\times 10^5 / \mu\text{l}$ )		
		Day 7	Day 9	Day 11
Non-treatment	0	$8.3 \pm 0.3$	$8.1 \pm 0.7$	$7.8 \pm 1.4$
Control	0	$3.6 \pm 0.6$	$5.8 \pm 1.1$	$8.3 \pm 0.4$
Native IL-6	50.0	$2.8 \pm 0.6$	$5.1 \pm 1.1$	$10.8 \pm 0.6^{**}$
	25.0	$3.2 \pm 0.2$	$6.2 \pm 0.2^*$	$9.9 \pm 0.7^*$
PEG-IL-6 Fr.4	1.0	$3.2 \pm 0.2$	$8.1 \pm 0.7^{**}$	$14.1 \pm 1.2^{**}$
	0.1	$4.2 \pm 0.4$	$6.8 \pm 0.4^{**}$	$12.5 \pm 1.2^{**}$

Native IL-6 and PEG-IL-6 Fr.4 were s.c. injected every 2 days for a week. Non-treatment mice were without treatment of 5-FU. Non-treatment and control mice recieved 0.05% BSA + 10 $\mu\text{g}$  PEG / saline. 5-FU ( 150mg / kg ) was administered i.p. on day 1. \* :  $p < 0.01$ , \*\* :  $p < 0.001$ , ( Compared with control group ), (  $n = 5$ , mean  $\pm$  SE )

5FU 投与後 day7 で血小板数は最小値を示し、正常レベルの約 40%、 $3 \times 10^5$  個/ $\mu$ l にまで減少し、その後回復に転じた。Native IL-6 投与群では  $50 \mu$ g / day/ mouse の投与によってもほとんど血小板数の回復促進効果は認められなかった。PEG5K-IL-6 Fr.4 投与群では、わずか  $0.1 \mu$ g / day/ mouse の投与においても day9 で control 群に比べて有意な血小板増加を示し、さらに  $1 \mu$ g / day/ mouse 投与群では正常レベルにまで回復する傾向が認められた。day11 には PEG5K-IL-6 Fr.4  $0.1 \mu$ g / day/ mouse の投与により Native IL-6  $50 \mu$ g / day/ mouse 投与を上まわる血小板増加が認められた。本結果より PEG5K-IL-6 Fr.4 の臨床的有効性が示唆された。本実験では、血小板最低値の改善は認められなかったが、今後、抗癌剤投与前に PEG5K-IL-6 Fr.4 を予防的に投与するなど、投与スケジュールを検討することにより十分に効果を期待し得るものと考えられた。

## 第六節 小括

本章では IL-6 をモデルとして用い、高分子バイオコンジュゲーションにより、サイトカインを有効かつ安全な医薬品として応用していく上での問題点、すなわち体内不安定性に因る有効性の乏しさ、および多様な生理作用を有することに起因する副作用の発現を克服し、臨床応用し得るサイトカイン DDS 製剤創製を試みた。はじめに血小板増加作用を効率的に増強し得る最適なバイオコンジュゲーション条件を見出すことを目的に、修飾率、分子量、活性、修飾分子の分子量、体内動態といった総合的なパラメータの相関を検討した。第一節で示したように PEG-IL-6 の比活性は修飾率、分子量の増大に伴って低下し、さらに修飾分子の分子量の増大に伴って活性の低下は著しいものであった。我々はこれまでに、SOD のバイオコンジュゲーションを試みてきたが、Superoxide anion のような低分子物質を基質とするような SOD の場合、修飾率の増大に伴って比活性の低下が観察されたものの、その低下率は修飾高分子の分子量に無関係であり、いずれの鎖長の修飾高分子でも同程度の比活性低下率を示すことを見い出している(81)。以上の事実は、SOD のように基質が低分子である場合には、修飾高分子が形成する立体障害によっては基質-酵素間の相互作用が殆ど影響されずに、修飾率（これにより生ずる活性中心の修飾や、立体構造の変化など）によってのみ、その活性が影響されることを示唆してい

る。一方 IL-6 のように活性発現に高分子レセプター (IL-6 receptor と gp130 の複合体 ; 210 kD) (82-87) との結合を要する生理活性蛋白質の高分子バイオコンジュゲーションでは、修飾高分子の立体障害によるレセプターとの結合阻害も活性低下に大きく影響することが明らかとなった。この結果は腫瘍壊死因子、TNF- $\alpha$  に関してもあてはまることを見出しており(26-31)、サイトカイン等の高分子バイオコンジュゲーションにおいては、活性発現に関与するアミノ酸残基の高分子修飾のみならず、修飾高分子の立体障害を十分考慮しなくてはならないことが示唆された。

次に *in vivo* での血小板増加作用を検討したところ、PEG5K-IL-6 の中で平均分子量 59,000 の Fr. 4 が最大の血小板増加作用を示し、その増強度合いは Native IL-6 の 500 倍と、過去に例を見ないものであった。また PEG12K-IL-6 では平均分子量 54,000 の Fr. 4 が最大の血小板増加作用を示し、PEG5K-IL-6 Fr.4 とほぼ同等の効果が認められた。これらのことより *in vivo* での作用増強を考えた場合、至適ハイブリッド条件が存在し、IL-6 の血小板増加作用の増強を目的とした PEG バイオコンジュゲーションでは、プロテアーゼ抵抗性を有しつつ、50%以上の比活性を保持した分子サイズ 5 万~6 万の PEG-IL-6 が最も目的治療作用に優れていることが明らかとなった。PEG 化 TNF- $\alpha$  に関しても抗腫瘍効果を指標に同様の検討を行った結果、十分な比活性を保持し (50%以上) かつプロテアーゼ抵抗性を有したうえで、PEG-TNF- $\alpha$  の分子サイズを 10 万~11 万に分子設計することで、はじめて抗腫瘍効果を 100 倍にも増強し得ることを見い出している。従って、単に分子サイズでのみ *in vivo* 作用の発現強度が規定されるのではなく、サイトカインの作用発現メカニズムを考慮しつつ、比活性やプロテアーゼ抵抗性等などの血中・組織での安定化等に関係する立体障害性と、血管内局在性や腎排泄、組織移行、組織からの吸収等に関係する分子サイズとの有機的連関を最適化していくことで、はじめてサイトカインの体内安定化や目的治療作用の効率的増強が可能になるものと考えられた。また体内動態、及びプロテアーゼ抵抗性などの検討から、IL-6 を PEG バイオコンジュゲーションすることで、プロテアーゼ抵抗性が向上し、またその腎排泄や組織移行性が抑制される結果、IL-6 の血中滞留性が約 100 倍にも大幅に向上されることが判明した。従って、目的とする血小板増加作用強度の増強は、標的とする巨核球が局在化する血中への滞留性が高まったためであると考えられた。一方、副作用の検討を行った結果、PEG5K-IL-6 Fr.4

は Native IL-6 と比較して副作用の発現強度は軽度であり、血小板増加作用がより選択的に増強されていることが示唆された。これは PEG バイオコンジュゲーションにより、全身組織への分布が抑制され、その結果、IL-6 の血管内での作用が効率よく増強されたことに因ると考えられる。これらのことから、IL-6 をはじめとするサイトカイン等のバイオコンジュゲーションは、単に閾値に高分子を結合させるのではなく、皮下組織からの移行性、血中安定性、標的細胞との親和性、比活性、といったパラメーターのバランスを考慮に入れなければならないことが明らかとなった。

臨床の場合において、抗癌剤、免疫抑制剤、放射線療法などによる血小板減少は極めて深刻な問題となっているが、未だ血小板産生作用を有する医薬品は開発されていない。血小板輸血は確実に血小板数を増加させることが可能であるが、血小板製剤の保存期間は短かいうえに、献血者も少ないために確保が難しく、また、頻回の輸血により抗血小板抗体の出現により血小板輸血不能となることが多いため、自己の血小板を効率よく増加させ得る医薬品の開発が切望されている(88)。そこで、血小板減少モデルマウスでの PEG5K-IL-6 Fr.4 の有効性を検討した。5-FU 投与マウスにおいて、PEG5K-IL-6 Fr.4 は Native IL-6 に比べて血小板数の回復を促進し、血小板減少期間の短縮が可能であることが判明した。今後動物種差等の検討も必要であるが、PEG-IL-6 の臨床応用が期待される結果が得られた。

以上のように、IL-6 に PEG バイオコンジュゲーションを適用し、目的とする血小板増加作用発現に適した生体内挙動特性（血管内局在性）を IL-6 に付与することで、血小板増加作用を選択的に増強させ得ること、すなわち IL-6 に作用の選択性を付与出来得ることが示された。しかしながら、最適なバイオコンジュゲート条件の選択は、未だトライ・アンド・エラーの段階であり、今後、サイエンスに立脚した体系的な研究としてゆくためには、被修飾アミノ酸残基の解析や水溶液中での高分子およびバイオコンジュゲート体の構造・挙動の把握、生体内動態、レセプターとの相互作用などの連関を解析してゆく必要があると考えられる。

## 第二章 より有効性の確保された高分子バイオコンジュゲート化サイトカインを創製し得る新規バイオコンジュゲーション法の開発

前章までの結果より、サイトカインの作用発現様式を考慮し、最適条件でサイトカインを高分子バイオコンジュゲーションすることで、サイトカインの体内安定性や標的組織移行・滞留性（IL-6；血中局在化能）を飛躍的に向上できるため、その投与量を大幅に削減でき得ること、また副作用発現関連組織への移行性や腎排泄速度を低下し得ること、その結果サイトカインの多様な *in vivo* 生理作用の中から、目的とする治療作用（IL-6；血小板増加作用）を効率よく引き出し得ることが明らかとなった。この高分子バイオコンジュゲーションによるサイトカインへの作用の選択性付与は、いわばサイトカインに作用の点での Targeting 能を付与することに他ならず、これまでにない新規な概念と言える。しかし、こういった高分子バイオコンジュゲーションは、サイトカインの比活性の大幅な低下を伴うため、潜在的に有するサイトカインの有用性を未だ十分に引き出し得ていないものと考えられる。これまで用いてきた、リジンアミノ基をターゲットとしたバイオコンジュゲーション法は、最も汎用されている方法であるが、本方法はリジン残基にランダムに修飾高分子を結合させようとするものであり、レセプター結合サイトへの高分子結合を免れ得ないという、欠点を併せ持っている。従って、サイトカインの高分子修飾部位を制御し、活性発現に関与しないアミノ酸残基に選択的に修飾高分子を導入し得る新たなバイオコンジュゲーション方法を開発することができれば、比活性の低下を最低限に抑えることが可能となり、投与量のさらなる削減など、バイオコンジュゲーションの有用性を一層向上させ得るものと期待できる。しかしながら現在、本アプローチをサイトカインの高分子バイオコンジュゲーションで行おうとする研究は殆どなされていない。そこで本章では、サイトカインの高分子バイオコンジュゲーションにおける修飾部位制御法の構築を目指した。なお、以降の実験においては、目的治療作用の更なる向上をまず第一に考え、血小板増加作用に関して主に検討を行った。

## 第一節 DMMA<sub>n</sub> 法による PEG 化サイトカインの比活性改善効果

本節では、修飾部位を制御し比活性を保持し得る新規バイオコンジュゲーション方法の開拓を目指した第一段階のアプローチとして、ジメチル無水マレイン酸 (Dimethylmaleic anhydride ; DMMA<sub>n</sub>) を用いた簡便な修飾部位制御法の開発を試みた。DMMA<sub>n</sub> は、pH 可逆的にアミノ基を保護し得る試薬である(89)。一方、サイトカインのレセプター結合部位はサイトカイン分子の表面に位置しているため、IL-6 のように活性発現領域近傍の立体的外側に配位したリジンアミノ基 (IL-6 ; Lys171、TNF- $\alpha$  ; Lys11・Lys90 など) (72,90) を DMMA<sub>n</sub> で予め保護した後に、残存する遊離のアミノ基に対して高分子バイオコンジュゲーションを行い、再び DMMA<sub>n</sub> を解離させることで、サイトカイン分子表面のレセプター結合サイト付近への高分子結合を防御し得るものと考えられる。そこで、この DMMA<sub>n</sub> による修飾制御法の有用性を評価するため、IL-6 や TNF- $\alpha$ 、G-CSF の DMMA<sub>n</sub> を用いた PEGylation を試みた。

### 実験材料と方法

#### DMMA<sub>n</sub> を用いた PEG-IL-6 (+) の作製

1mg/ml の IL-6 リン酸緩衝溶液 500  $\mu$ l をまず、0.1N 水酸化ナトリウムを添加することで pH8.5 とした。16.8mg/ml の dimethylmaleic anhydride (DMMA<sub>n</sub>、Acros Organics、USA) の dimethylsulfoxide (DMSO) 溶液を氷冷下 2.5  $\mu$ l (IL-6 のリジンアミノ基に対して 10 倍 mol 量) 添加した。0.1N 水酸化ナトリウムを加えて pH8.5 に再調整した後、緩やかに攪拌しながら 30 分間反応させた。続いて methoxypolyethylene glycol succinimidyl succinate (ssPEG、平均分子量 5,000、Sigma Chemicals Co.、USA) を 16.7mg 加え、室温に戻して 30 分間 PEG バイオコンジュゲーション反応を行った。氷冷下でさらに 30 分置いた後、0.1N 塩酸で pH6.0 に調整、37°C、1 時間インキュベートすることで DMMA<sub>n</sub> の解離反応を行った。一方コントロールとして、DMMA<sub>n</sub> を用いない従来の方法 (第一章第一節) により PEG-IL-6 を作製した。作製した PEG-IL-6 はゲルろ過 HPLC により分画精製した。



### PEG-TNF- $\alpha$ およびPEG-G-CSFの作製

腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ 、持田製薬株式会社、東京、より供与)、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF、中外製薬株式会社、東京、より供与) の PEG バイオコンジュゲーションはPEG-IL-6の作製法(第一章第一節)に準じた。DMMAAnを用いた PEG バイオコンジュゲート体の作製は PEG-IL-6(+)の作成法に準じた。

### フルオレスカミン法による反応状態のモニタリング

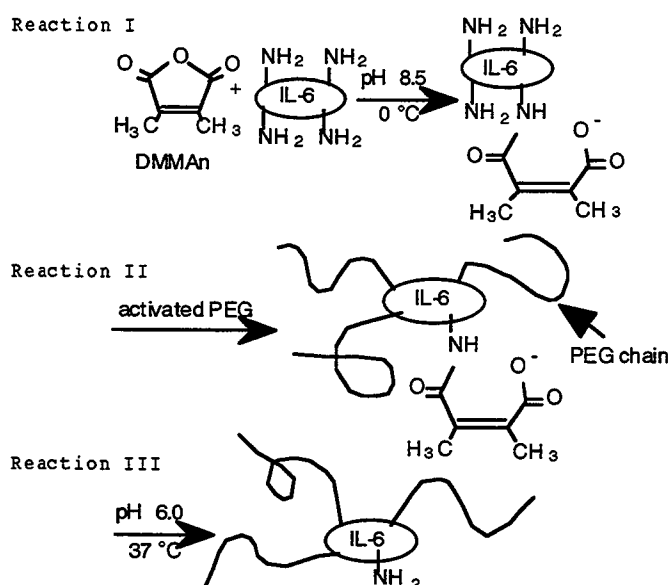
各反応段階ごとに PEG-IL-6 反応液を 10  $\mu$ l ずつサンプリングし、残存アミノ基の割合を定量することで反応の進行をモニタリングした(91)。0.1% PEG (平均分子量 6,000、和光純薬工業株式会社、大阪) を含むホウ酸緩衝液 (pH8.5) 490  $\mu$ l にサンプル 10  $\mu$ l を加え混合した後、Fluorescamine の dioxan 溶液 (0.3mg/ml、Fluka、東京) を 500  $\mu$ l 添加混合した。10 分後、蛍光強度 (励起波長 390nm、蛍光波長 475nm) を蛍光光度計 (日本分光工業株式会社、東京) により測定した。残存アミノ基の割合は、Native IL-6 の値を 100% として計算した。

### In vitro 比活性の測定

DMMAAn を用いて作製した PEG-IL-6 の比活性 (残存活性) 測定は第一章第一節に準じた。PEG-TNF- $\alpha$  の比活性測定は Yamazaki らによる LM 細胞を用いた活性測定法により算出した(92)。比活性は Japan Reference Unit (JRU) で表した。G-CSF の残存活性は Shimada らによる NFS-60 細胞を用いた活性測定法により測定した(93)。

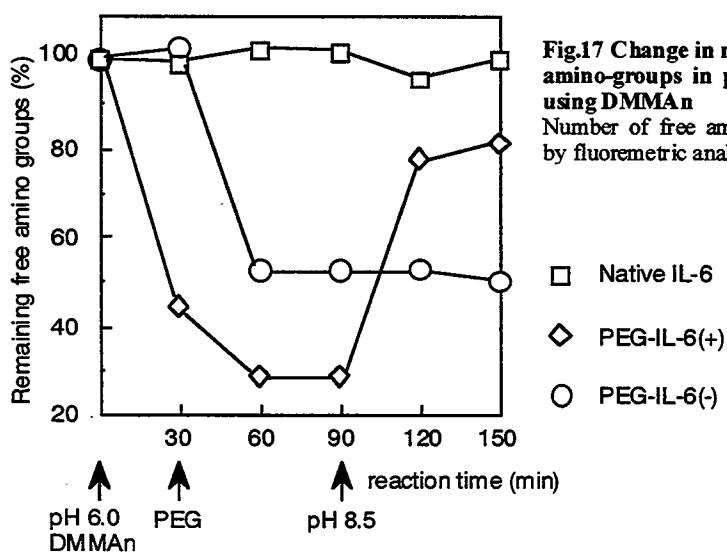
### 結果および考察

DMMAAn は pH 可逆的なアミノ基保護試薬であり、ランダムにアミノ基と反応する。しかしながら、反応条件 (添加量) を調節することで、まず優先的に分子表面に位置するレセプター結合サイト周辺のリジンアミノ基を保護し得るものと考えられる。また、本方法は非常に簡便であると同時に、サイトカインという、安定性に乏しい蛋白質にとって穏やかな条件で反応が行えるという利点を有している。DMMAAn を用いた PEG 化 IL-6 の作製は Fig.16 に示す方



**Fig.16 Schematic protocol of PEGylation of IL-6 using DMMAAn**  
 Reaction I. Protection of partial amino groups by DMMAAn  
 Reaction II. PEGylation to remained lysine amino groups  
 Reaction III. Regeneration of amino groups by releasing DMMAAn

法で行い、各反応の進行をフルオレスカミン法によりモニタリングしたところ、残存アミノ基数の変化から、DMMAAn による保護反応、および PEG バイオコンジュゲーションが確かに行われていることが明らかとなった (Fig.17)。作製した PEG-IL-6 をゲルろ過 HPLC により分画精製し、第一章の結果より PEG-IL-6 の中で最も血小板産生作用の大きかった分子サイズ Fr.4 (以後 MPEG-IL-6 と表す) について検討を行った。また、DMMAAn 法で作製したものを MPEG-IL-6(+)、従来法で作製したものを MPEG-IL-6(-)と表した。Table V に示すように、DMMAAn 法により、MPEG-IL-6(+ )の比活性は MPEG-IL-6(-) に比べ 2.4 倍にも向上した。MPEG-IL-6(+ )と MPEG-IL-6(-)の修飾率、分子



**Fig.17 Change in number of remaining free amino-groups in preparation of PEG-IL-6 using DMMAAn**  
 Number of free amino-groups was measured by fluoremetric analysis using fluorescamine.

**Table V Improvement of specific activity of PEG-IL-6 using DMMA n**

	Mn <sup>a)</sup>	D.M. (%) <sup>b)</sup>	Remaining activity (%)	
			DMMA n(-)	DMMA n(+)
MPEG-IL-6	59,000	54.0	14.7 ± 3.3	35.3 ± 1.1

a) Average molecular weight

b) Degree of modification

c) Remaining activities were estimated by bioassays using MH-60 cells and compared with native IL-6 activity as 100%

サイズは同じであること、また、IL-6 分子中の Lys 171 は分子表面のレセプター結合サイト周辺に位置し、活性発現に関与することが知られていることから(72)、DMMA n 法による比活性の改善は、活性中心に位置するリジンアミノ基を効率よく保護し得たためであると考えられた。同様の方法で作成した PEG- TNF-  $\alpha$  および PEG- G- CSF についても検討したところ、PEG- IL- 6 と同様に、それぞれ同一修飾率（分子サイズ）において、比活性の改善効果が認められた（Table VI）。TNF-  $\alpha$  および G- CSF に関しても、その分子表面のレセプター結合サイト近傍にリジン残基を有することが明らかとなっていることから(90,94)、本方法は IL- 6 以外のサイトカインにも適用可能であることが明らかとなった。

**Table VI-1 Improvement in specific activity of PEG-TNF-  $\alpha$ s using DMMA n**

	Mn <sup>c)</sup>	Specific activity <sup>a)</sup> ( $\times 10^5$ JRU/mg protein)		Increase (%) <sup>b)</sup>
		DMMA n(-)	DMMA n(+)	
HPEG-TNF- $\alpha$	122,000	1.29 ± 0.31	1.83 ± 0.30 *	42.0
MPEG-TNF- $\alpha$	108,000	2.03 ± 0.33	2.92 ± 0.31 **	43.8
LPEG-TNF- $\alpha$	84,000	2.66 ± 0.40	3.22 ± 0.24	21.3
Native TNF- $\alpha$	58,000	4.67 ± 0.39		

a) Specific activity was measured by bioassays using LM cells.

b) compared to DMMA n(-)

c) Mn (average molecular weight) was calculated by GF-HPLC analysis

Statistical significance compared with DMMA n(-): \*P < 0.05, \*\*P < 0.01.

Table VI-2 Improvement in specific activity of PEG-G-CSFs using DMMAAn

	Remaining activity (%) <sup>a)</sup>		Increase (%) <sup>b)</sup>
	DMMAAn(-)	DMMAAn(+)	
HPEG-G-CSF	17.5 ± 2.9	25.2 ± 5.3 *	44.0 *
MPEG- G-CSF	40.7 ± 10.6	50.7 ± 4.1	24.6
LPEG- G-CSF	59.3 ± 13.1	66.4 ± 13.5	12.0
Native G-CSF	100		

a) Specific activity was measured by bioassays using NFS-60 cells.

b) compared to DMMAAn(-)

Each value represents the mean ± SD.

Statistical significance compared with DMMAAn(-): \*P < 0.05.

第二節 PEG- IL- 6(+) による in vivo 治療効果の改善

前節で DMMAAn による修飾部位制御を行うことで、in vitro 比活性が大幅に向上できることが判明した。そこで次に PEG-IL-6(+) の有効性を in vivo で評価した。

実験材料と方法

血小板増加作用の評価

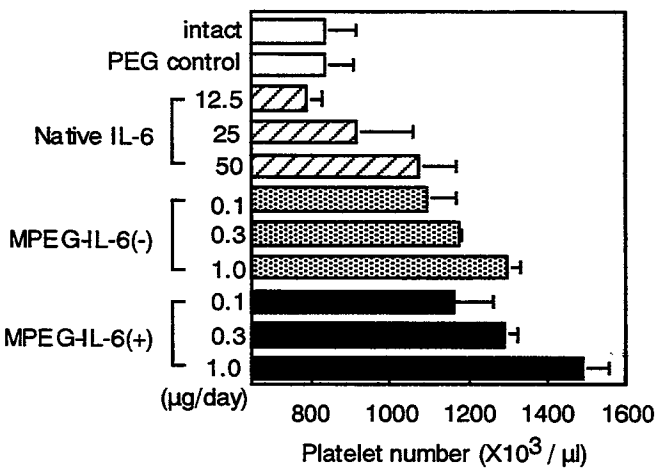
in vivo 血小板増加作用の評価は第一章第二節に準じた。Native IL-6 あるいは各 PEG-IL-6 を、C3H マウス（雄、5 週齢、日本 SLC 株式会社、静岡）に 2 日に 1 回、計 4 回皮下投与し、末梢血小板数を測定した。

結果および考察

血小板数が最大となった day9 において、PEG-IL-6 の修飾部位制御による有用性を評価した（Fig.18）。第一章でも述べた通り、従来法で作製した MPEG-IL-6(-) は 0.1 μg/day/mouse の投与で Native IL-6 50 μg/day/mouse 投与と同程度、すなわち、500 分の 1 量で同等の血小板増加作用を示した。一方、MPEG-IL-6(+) においては、0.3 μg/day/mouse 投与で、MPEG-IL-6 (-) 1.0 μg/day/mouse 投与群と同程度の血小板増加作用を示したことから、MPEG-IL-6(-) のさらに約 3 倍にも血小板増加作用が増強されていた。従って MPEG-IL-6(+) では、Native IL-6 に比べ、単純計算で約 1,500 倍にも作用増強がされていることになり、DMMAAn を用いた修飾部位制御によ

る新規バイオコンジュゲーション法の有用性が示された。

以上の結果より、高分子バイオコンジュゲート化サイトカインの創製に際し、修飾制御を行うことで、サイトカインの有する作用をより効率的に発現させ得ることが明らかとなり、修飾制御による比活性改善を目指したアプローチの有用性が示された。



**Fig.18 Peripheral platelet number in mice on day9 after administration of PEG-IL-6 using DMMAn**

Mice were given native IL-6 or MPEG-IL-6 subcutaneously every 2 days for 8days. PEG control mice were given 10 μg of PEG in saline with 0.05% BSA. Blood was taken from tail vein and platelet number was counted with a platelet counter. Peaked platelet number on day9 were indicated. (n=3 or 6, mean±SE)

### 第三節 小括

本章では、サイトカイン高分子バイオコンジュゲーションの更なるシステムアップを図る一つのアプローチのとして、修飾部位制御を提示し、より有効性の確保されたバイオコンジュゲート体の創製を試みた。高分子バイオコンジュゲーションは生体内安定性を向上させる一方で比活性の低下を同時に伴ってしまうため、両刃の剣となってしまっている。従って比活性を低下させない修飾方法、すなわち修飾部位をコントロールする技術の開発により、高分子バイオコンジュゲーションのシステムアップが図れるものと考えられる。

現在、一般に行われているバイオコンジュゲーション法は、PEG バイオコンジュゲーションに限らず、糖鎖を蛋白質に付与しようとするアプローチにおいても、多くはリジンアミノ基をターゲットとしている(95,96)。これは穏和な反応条件で、効率よく修飾分子を蛋白質に付加できるからに他ならない。また、現在行われているリジンアミノ基への修飾は全てランダムな反応でしかないため、レセプター結合部位や立体構造維持領域近傍にリジン残基が存在している場合、必然的に比活性の低下を招いてしまうことになる。一方でリジンア

ミノ基以外のカルボキシル基やチオール基をターゲットとするコンジュゲーション方法(70,71)もあるものの、いずれもリジン残基と同様、レセプター結合や立体構造維持に不可欠な役割を担っている場合があるうえ、これらアミノ酸残基に対しても部位特異的なバイオコンジュゲーション技術は存在しない。遺伝子組み替えにより、元来僅かしか生理活性蛋白質に含まれていないシステインなどのアミノ酸を、生理活性蛋白質の活性発現に関与しない領域に導入した変異蛋白質を作製し、その変異アミノ酸残基を標的とするコンジュゲーション方法も考案されてきている(97)。しかし、現時点で多くのアミノ酸を改変するのは困難で、立体構造の変化などを来す恐れを多分にはらんでいるのが実状である。従って、比活性を保ったままバイオコンジュゲーションを行い得る、修飾部位制御法の開発が必要である。そして、比活性保持を目指したアプローチの有用性を明らかにすることで、サイトカイン・バイオコンジュゲーションにおける一つのシステムアップ法を提示し得るものと考えられた。そこで本章では、まず、本アプローチの足がかりとして、簡便かつ有効な修飾部位制御法の構築を試みた。

DMMA<sub>n</sub> は穏和な条件で pH 可逆的にアミノ基を保護することが可能である。その反応様式はランダムであるものの、保護条件を調節することで、分子表面に位置するリジンアミノ基を優先的に保護し得るものと考えられる。本章での検討で、IL-6、TNF- $\alpha$ 、G-CSF の PEG バイオコンジュゲーションに DMMA<sub>n</sub> 法を適用した結果、確かに比活性低下を改善し得ることが明らかとなった。また、比活性を向上させることで、*in vivo* での目的治療効果を大幅に高め得ること、例えば IL-6 の場合、Native IL-6 の 1,500 倍にも目的とする *in vivo* 活性を高め得ることが可能であった。この目的治療作用の増強倍数は、この分野のみならず、関連分野をも含めて得られている作用増強の中でこれまでに例を見ない最大のものであった。今後、高分子バイオコンジュゲーションに本アプローチを適用することで、投与量の大幅な削減が可能となるため、さらなる安全性の向上が期待できるものと考えられる。

本章の結果より、高分子バイオコンジュゲーションを行うに際し、修飾部位制御法を適用することの有用性が明らかとなった。今後、実際の修飾部位の解析を行う一方で、サイトカインの種類に応じて、また水溶液中の高分子の構造や挙動を考慮に入れ、意図するままに高分子の修飾部位を制御し得る方法を開発してゆかなければならないものと考えられる。

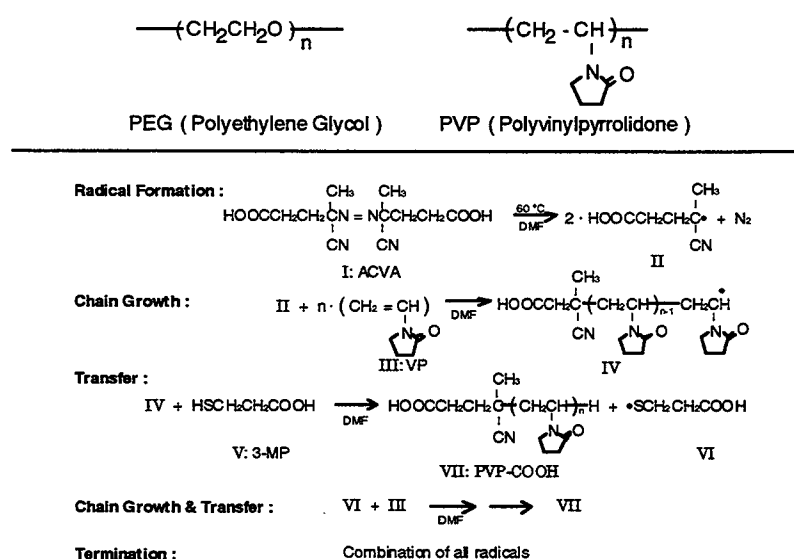
### 第三章 緻密な生体内挙動制御と機能付与を目指した新規修飾高分子の開発

高分子バイオコンジュゲーションをより有用な次世代創薬テクノロジーとしてシステムアップしていくにあたり、前章では、バイオコンジュゲーションによって生じる比活性低下を回避し得る新たなバイオコンジュゲーション方法の開発を試みた。一方で、高分子バイオコンジュゲーションの最大の利点は修飾高分子に二次的機能（付加価値）を持たせることで、体内安定性に優れ、かつ作用の選択性をも付与されたバイオコンジュゲート体に、さらなる有用性、安全性確保のための新たな DDS 機能・特性を付与できることにある。すなわち、次世代創薬法として高分子バイオコンジュゲーションを揺るぎないものとしていくためには、個々の薬物の種類に応じて、またバイオコンジュゲーションの目的に応じてバイオコンジュゲート体の生体内挙動を任意に制御し得る DDS 機能、例えば標的指向性や Biological Response Modifier 様の付加機能を高分子にさらに付与していくことが必要となってくる。しかしながら前章まで修飾高分子として用いてきた PEG は、その分子構造上新たな特性の付与は困難であるため、本アプローチを進めるためには、PEG が有する修飾高分子としての有用な特徴も保持しつつ、さらに種々特性のアレンジが可能な新規修飾高分子を開発しなければならない。以上の観点から我々は、種々の物理化学的特性（分子量、電荷、親水・疎水バランスなど）や官能基特性を有する 50 種以上の水溶性高分子の血中動態や組織移行性・滞留性、細胞親和性などを評価してきた。その結果、同じ分子量（平均分子量 5,000）の高分子でも、カルボキシル基を側鎖に有する高分子は腎集積性が高く、ラウリン酸のように疎水性官能基を側鎖に有する高分子は脾臓集積性が高いこと、また、ポリスチレンマレイン酸（SMA）は高い肝臓集積性を示すうえ、SMA を蛋白質に結合させることで、その蛋白質を肝臓に集積させ得ることなどを明らかにしている。すなわち修飾高分子の主鎖構造や側鎖官能基の種類によってそれぞれ特徴的な生体内挙動を示すこと、またこれら修飾高分子の動態的特性をバイオコンジュゲート体の体内挙動特性に反映し得ることなど、機能性修飾高分子の創製によりバイオコンジュゲート体に新たな DDS 機能を付与し得ることを見出してきた(32,33)。従って、バイオコンジュゲーションのさらなるシステムアップを行うための修飾高分子として、薬物の種類やバイオコンジュゲーションの目的に適

した物理化学的特性や、官能基特性を容易に、かつ自由にコントロールし得る、PEG に代わる修飾高分子の開発が望まれる。そこで本章では、以上の目的に適い得る新規修飾高分子として Polyvinylpyrrolidone (PVP) を提示し、高分子バイオコンジュゲーションにおける有用性を評価した。

## 第一節 新規修飾高分子 PVP の合成とバイオコンジュゲート化特性の評価

PVP は PEG と同様に非電荷水溶性合成高分子であり、医薬品材料としても用いられており、安全性が確立している局方収載の高分子である (Fig.19) (98)。PVP はラジカル重合法により容易に合成可能である上、PVP を幹として種々の官能基を有するビニル化合物と共重合することで、多様な物理化学的特性や官能基特性を有する共重合体の創製が可能である。本章では IL-6 のバイオコンジュゲーションに PVP を適用し、高分子側からのシステムアップの第一段階として、幹修飾高分子 PVP (PVP 単重合体) の有用性を評価した。



**Fig.19 Schematic protocol of synthesis of PVP with a carboxyl group at one end of the main chain**  
 ACVA: 4,4-azobis(4-cyanovaleric acid)  
 DMF: Dimethylformamide  
 VP: N-Vinyl-2-pyrrolidone  
 3-MP: 3-mercaptopropionic acid

## 実験材料と方法

### 片末端活性化 PVP の合成

片末端活性化型の polyvinylpyrrolidone (PVP) は、ラジカル開始剤と



して 4,4'-azobis(4-cyanovaleric acid) (ACVA)、連鎖移動剤として 3-mercaptopropionic acid (3-MP) を用いるラジカル重合法により合成した。室温で 3.3 g (270 mmol) の N-vinyl-2-pyrrolidone (VP、和光純薬工業株式会社、大阪) を 12 ml の N,N-dimethylformamide (DMF) に溶解し、開始剤として ACVA (和光純薬工業株式会社、大阪) を 270 mg (1.2 mmol)、連鎖移動剤として 3-MP (和光純薬工業株式会社、大阪) を種々の割合 (VP に対して 0~3/10 mol 量) で加えた。次に溶液を重合管中で凍結し、減圧脱気操作後、封管した。60 °C で 6 時間反応後、反応液を diethylether 中に滴下することで PVP を抽出し、減圧デシケータ中で乾燥させた。得られた PVP は精製水中で透析し (Spectra/ Por 3、MWCO 3,500、The Spectrum Companies、USA)、低分子化合物を除去した。さらに、ゲルろ過クロマトグラフィー (Sephadex G-75 super fine、Amersham Pharmacia Biotech、Sweden) によって分取精製後、凍結乾燥した。PVP の平均分子量として、ゲルろ過 HPLC (TSKgel G4000PWxL、東ソー株式会社、東京) により、PEG スタンダード (TSKstandard polyethylene oxide、東ソー株式会社、東京) を用いた分子量較正曲線から算出した相対値としての数平均分子量 ( $M_n$ ) を適用した。PVP の活性化は、PVP 200 mg を 1 ml の DMF に溶解し、N-hydroxysuccinimide (NHS、和光純薬工業株式会社、大阪) を 44.2 mg (384 mmol)、Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) を 79.2 mg (384 mmol) 加えた。室温で 24 時間反応させ、遠心分離により不溶物を除去した後、上清を diethylether に滴下し、沈殿を濾過回収することで片末端活性化 PVP を得た。

#### PVP-IL-6 の合成

PVP-IL-6 の合成は前記活性化 PVP を用い、反応は第一章第一節に準じた。1.4mg/ml の recombinant human IL-6 (IL-6、中外製薬株式会社、東京、より供与) を含む PBS 溶液 (リン酸緩衝化生理食塩液、pH7.4) 500  $\mu$ l に、活性化 PVP 28mg (溶液中に含まれる IL-6 のリジンアミノ基に対して 10 倍モル当量) を加えて混合し、室温下、30 分間穏やかに攪拌させることで、IL-6 のリジンアミノ基に対して PEG バイオコンジュゲーションを行った。その後、0.3mg の  $\epsilon$ -aminocaproic acid (Sigma Chemicals Co.、USA、PVP に対して 5 倍モル量) を添加することで反応を競合停止させた。反応後すみやかにゲルろ過 HPLC (カラム: Superose12、Amersham Pharmacia Biotech、Sweden、

溶離液: 0.05M リン酸緩衝液、0.15M NaCl、pH7.2) により各種分子サイズに分画精製した。

## PVP-IL-6 の in vitro 活性測定

PVP-IL-6 の in vitro 活性測定法は第一章第一節に準じた。

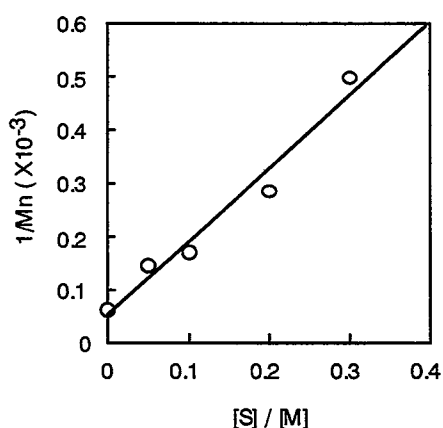
## 結果及び考察

新たな付加価値を構造上、導入することが困難な PEG に代わる新規修飾高分子として、安全性が高く、かつ将来的に様々な特性のアレンジが可能な高分子として PVP を選択した。バイオコンジュゲーションを行う際に、両末端が活性化されると複雑な複合体を形成する恐れがあるため、主鎖片末端にのみカルボキシル基を導入できるラジカル重合法を開発した。本方法では、ラジカル開始剤としてカルボキシル基を有するアゾ化合物、ACVA を、連鎖移動剤としてカルボキシル基を有する 3-MP を用いた。その結果、連鎖移動剤の混合比により平均分子量、数百～数十万の PVP が合成可能であった (Table VII)。また、F.R. Mayo らの理論(99)に従い、VP モノマー濃度に対する連鎖移動剤 (3-MP) 濃度の比と平均分子量  $M_n$  の逆数との間に直線関係が認められたことから、本連鎖移動反応が確かに起こっていること、即ち主鎖片末端にカルボキシル基が導入されていることが確認された (Fig.20)。本実験では PEG5K に最も近い分子量の PVP を効率よく合成し得る条件 (run 3) で重合を行い、ゲルろ過によって分取精製を行い、平均分子量 6,000 の PVP6K を得た。ゲルろ過 HPLC 解析の結果、得られた PVP6K の分子量分布は PEG5K よりも小さく、以下の実験を行う上で十分シャープなものであると考えられた。本 PVP6K

**TABLE VII** Number average molecular weight ( $M_n$ ) of products of PVP synthesis in addition of various amounts of transfer agent

run	VP (mmol)	Initiator (mmol)	Transfer agent (mmol)	$M_n$ ( $\times 10^3$ )	Yield (%)
1	27	1.2 (1/25)	0	15.2	88
2	27	1.2 (1/25)	1.35 (1/20)	6.8	85
3	27	1.2 (1/25)	2.70 (1/10)	5.8	57
4	27	1.2 (1/25)	5.40 (1/5)	3.5	38
5	27	1.2 (1/25)	8.10 (3/10)	2.0	8.3

$M_n$  was determined by GFC with PEG standard.



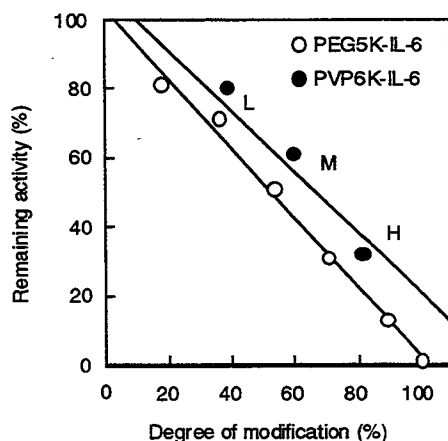
**Fig.20 Analysis of PVP radical polymerization with carboxyl group at one end of the main chain**  
The relation with Mayo's equation was represented. [S]: concentration of transfer reagent, [M]: concentration of vinylpyrrolidone monomer in mixture before the reaction, [Mn] : number average molecular weight of resulted polyvinylpyrrolidone

を用いて IL-6 のバイオコンジュゲーションを行い、PVP-IL-6 を作製した。PVP-IL-6 は3つの分子サイズ (H: High、M: Middle、L: Low) に分画精製し、in vitro 比活性を測定した。比活性は PEG-IL-6 と同様、修飾率の増加に伴って減少し、修飾率と活性の相関は PEG5K-IL-6 と同様の傾向を示すことが判明した (Table VIII、Fig.21)。

**Table VIII Characterization of PVP-IL-6s**

Fraction	a) Mn	Degree of Modification (%) b)	Remaining Activity (%) c)
HPVP-IL-6	89,000	81	32
MPVP-IL-6	71,000	60	61
LPVP-IL-6	54,000	39	80
Native-IL-6	21,000	0	100

PVP (Mn 6,000) was used this reaction. PVP-IL-6s was separated into three fractions by GF-HPLC. a ) Mn was calculated by GF-HPLC ( protein standard ). b ) calculated from Mn , c ) measured by bioassays using MH-60 cells and indicated with Native IL-6 as 100%.



**Fig.21 Relationshop between degree of modification and remaining activities of PVP-IL-6s**

## 第二節 PVP-IL-6 の in vivo 血小板増加作用増強効果

本節では PVP-IL-6 の血小板増加作用を検討し、PVP バイオコンジュゲーションの有用性を評価した。

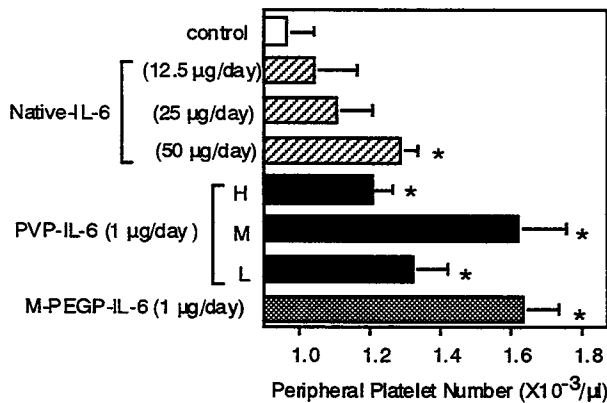
### 実験材料と方法

#### PVP-IL-6 の血小板増加作用

血小板増加作用の評価は第一章第二節に準じた。Native IL-6 あるいは PVP-IL-6 を C3H マウスに 2 日に 1 回、計 4 回、皮下投与し、血小板数を測定した。control 群には 10  $\mu$ g の PVP を投与し、比較として PEG5K-IL-6 Fr.4 (MPEG-IL-6) の投与も行った。

### 結果および考察

我々のこれまでの検討で、修飾高分子単体としての PVP6K は、PEG5K に比べ静脈内投与後の投与半減期が数倍長いことが明らかになっていることから、PVP バイオコンジュゲーションは PEG バイオコンジュゲーションと比較して、さらなる IL-6 の血中滞留性の向上を期待できる。第一章で記載したように、IL-6 の目的とする血小板増加作用は、血中に局在化する巨核球を刺激することで発現されるため、本節では PVP の幹高分子としての有用性を評価すると共に、血小板増加作用を高進していくことを目的に、VP homopolymer を用いて作製した PVP-IL-6 の効果を検討した。PVP-IL-6 の in vivo 血小板増加作用を PEG-IL-6 の中で最も血小板増加作用の大きかった MPEG-IL-6 と比較したところ、MPVP-IL-6 (平均分子量 71,000) の効果が最も大きく、MPEG-IL-6 と同等の血小板増加作用を示すことが判明した (Fig.22)。しかしながら本結果が示すように、PVP-IL-6 では組織移行の低下などによる血中滞留性のさらなる向上が期待されたにも関わらず、PEG-IL-6 をさらに上回る血小板増加効果は得られなかった。また、PVP バイオコンジュゲート体についても至適コンジュゲート条件の存在が明らかとなった。しかしながら、至適分子サイズは PEG-IL-6 の場合 (59,000) とは異なっていた。以上の PEG-IL-6 と PVP-IL-6 で至適分子サイズが異なってきたこと、及びその in vivo 血小板



**Fig.22 Thrombopoietic activity of PVP-IL-6s**  
Peripheral platelet numbers of mice on day 11 were shown. Normal C3H mice were given native IL-6, PVP-IL-6 or M-PEG-IL-6 subcutaneously every 2 days for 8 days. Blood was taken from the tail vein and platelet number was counted with a platelet counter. Platelet number peaked on day 11. Control mice were given 10 μg of PVP polymer in saline. Mice were used in groups of five. Each value represents the mean  $\pm$  SE. Statistical significance compared with control: \*  $P < 0.01$ .

増加作用が同程度であったことの要因としては、投与ルートが皮下ということを加味し、各々のバイオコンジュゲート体の組織中での安定性、組織から血中への吸収性、血中での滞留性・安定性、血中から組織への移行性などの有機的連関が、用いる修飾高分子によって、その最適条件が異なってくるためであると考えられる。従って今後、体内動態の検討を行うとともに、修飾制御や、より最適化された PVP 誘導体を見出していくことで、PVP バイオコンジュゲーションのさらなる有用性確保が可能になると共に、新たな付加価値を導入し得ない PEG バイオコンジュゲーションを上回る PVP バイオコンジュゲーションの確立が可能になるものと期待できる。

### 第三節 LIF の PVP バイオコンジュゲーション効果

前節において、PVP バイオコンジュゲーションの有用性、また、IL-6 の血中滞留性を向上させることで、目的とする血小板増加作用を効率よく増強し得ること、また最適なバイオコンジュゲーション条件が存在することなどを明らかにした。本節では、この PVP バイオコンジュゲーションが他のサイトカインにも適用可能であるかなど、その有用性を評価することを目的に、IL-6 と同様に血小板増加作用を有するサイトカインについて、バイオコンジュゲート化特性の検討を試みた。

現在、IL-6 以外に血小板産生を刺激するサイトカインとしては、Thrombopoietin (TPO)、IL-3、IL-11、SCF、Leukemia Inhibitory Factor (LIF) などが知られている(34-40)。本実験では IL-6 と類似の分子量、Lys 残基数をもつ LIF についてバイオコンジュゲーションを行い、PVP バイオコンジュゲーションによる血中滞留性の向上が血小板増加作用増強をもたらすかと

うか、また、至適ハイブリッド条件が存在するかどうか検討した。

## 実験材料と方法

### PVP-LIF の合成

1 mg/ml の recombinant human LIF (LIF、中外製薬株式会社、東京、より供与)500  $\mu$ l を 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2 で調製し、9 mg の活性化 PVP (Lys アミノ基に対して 5 倍 mol 量)を加え、室温下 30 分間反応させた。1 mg の  $\epsilon$ -aminocaproic acid (Sigma Chemicals Co., USA) を加えて反応を停止し、ただちにゲルろ過 HPLC (TSKgel G3000SWxL、東ソー株式会社、東京、溶離液 : 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2) により分画精製した。

### PVP-LIF の in vitro 活性測定

PVP-LIF の残存活性の測定は Yamamoto らの報告による、M1 細胞を用いた LIF 活性測定法(100)を一部改変して行った。M1 細胞は増殖培地(10 % FCS 添加アミノ酸・ビタミン倍加 Eagle's MEM、日水製薬、東京)により維持継代したものをを用いた。各サンプルの希釈列を 96 穴培養ディッシュに作製し、 $5 \times 10^3$  個ずつ M1 細胞を播種した。37°C、72 時間培養後、MTT 法により細胞増殖阻害活性を測定した。残存活性は Native LIF の活性を 100 %として計算した。

### PVP-LIF 血小板増加作用増強効果

PVP-LIF の血小板増加作用の評価は第一章第二節の方法に準じた。C3H マウス(雄、5 週齢、日本 SLC 株式会社、静岡)に 7 日間連日皮下投与し、経日的に血小板数を測定することによって評価した。

## 結果及び考察

LIF は IL-6 と同様に巨核球の成熟促進作用をはじめとする多彩な生物活性を有するサイトカインであり (Table IX) (101-104)、分子量は 2 万、Lys アミノ基を 12 個有していることが知られている(105)。またその作用発現様式は IL-6 と同様、血管内に局在する巨核球の成熟を刺激することで、血小板増

**Table IX** Multiple actions of LIF

Differentiation Commitment	
Induction in myeloid leukemic cells	- M1 - HL60 - U937
Induction in <i>myc</i> -initiated erythroleukemic cells	
Suppression in normal embryonic stem cells	
Proliferative Actions	
<i>DA-1 hemopoietic cells</i>	
<i>Osteoblasts</i>	
Potentiation of IL-3 stimulation of	- blast cell precursors - megakaryocyte precursors - erythroleukemic cells
Functional Actions	
<i>Calcium release from bones</i>	
<i>Stimulation of new bone formation</i>	
<i>Production of acute phase protein by hepatocytes</i>	
<i>Switching of signaling by autonomic neurones</i>	
<i>Depletion of body fat</i>	
<i>Induction of gonadal dysgenesis</i>	
<i>Elevation of platelet levels</i>	

加作用を発揮することが明らかとなっている(101,102)。また LIF の副作用発現様式は、肝臓・脾臓をはじめとする全身組織への移行が主要な要因となっていることが判明している(99)。従って、LIF についても血中滞留性の向上を目指した高分子バイオコンジュゲーションが、目的作用の選択的増強に直結するものと考えられる。PVP-LIF の合成は、PVP-IL-6 と同様の反応条件で行い、ゲルろ過 HPLC により 3 つの分子サイズ (H: High、M: Middle、L: Low) に分画した (Table X)。残存活性は修飾率の増加に伴って減少したが、活性低下の度合いが著しく、修飾率 21 %の fraction 3 でさえ残存活性は 37 %となった。LIF の 150 番目から 180 番目のアミノ酸配列がレセプター結合に重要な部位であり、分子表面に位置することが報告されている(103)。この領域に全 12 個の

**Table X** Characterization of PVP-LIF

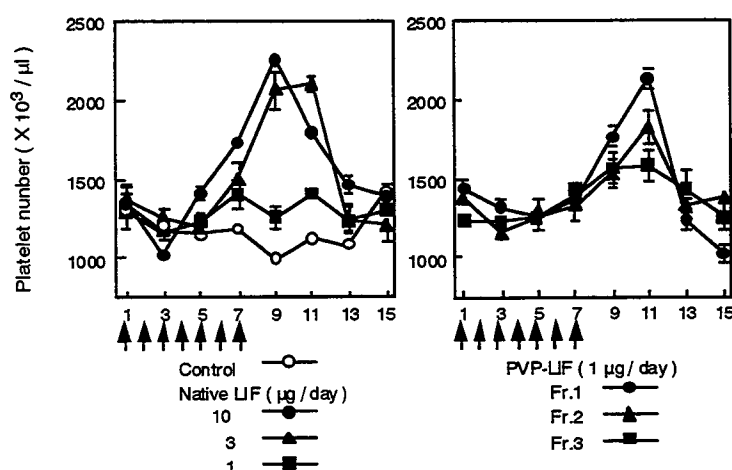
Fraction	Mn <sup>1)</sup>	Modified Lys residues	Degree of Modification (%)	Remaining <sup>3)</sup> Activity (%)
1	82,000	11.6	97	20
2	51,000	6.5	54	29
3	28,000	2.6	22	37
Native LIF	12,300 <sup>2)</sup>			

1) Mn was calculated by GF-HPLC with protein standard.

2) Mn determined by GF-HPLC was shown. Molecular weight of Native LIF calculated from amino acid sequences is 20,000.

3) Remaining activity was estimated by bioassay with M1 cells.

リジン残基のうち 6 個が存在しているため、LIF の場合、活性発現に重要なリジン残基が修飾を受け易く、低修飾率でも活性の低下が著しかったものと考えられる。in vivo 血小板増加作用は連日 7 日間投与で評価した (Fig 23)。PVP バイオコンジュゲーションにより血小板増加作用は増強されていた。高修飾率の PVP-LIF ほど in vivo で作用が大きく、最も血小板増加作用の大きかった分子量 82,000 の H-PVP-LIF では  $1 \mu\text{g/day/mouse}$  の投与で Native LIF  $3 \mu\text{g} \sim 10 \mu\text{g/day/mouse}$  と同程度の血小板増加が観察された。これらの結果から、比活性の大幅な低下が in vivo で効果増強が数倍に留まってしまった大きな要因と考えられた。従って、LIF は第二章で示したような修飾部位制御法の適用により、大幅な in vivo 効果増強が期待できるものと考えられる。PVP-LIF の作用増強機構に関しては皮下投与後の血中滞留性の増大が大きく影響しているものと推測されるが、詳細なメカニズムの解明には体内動態の検討などが必要である。



**Fig.23 Platelet number after s.c. injection of PVP-LIF**  
C3H mice were administered native LIF or PVP-LIF subcutaneously every day for a week. Native LIF and PVP-LIF were diluted with saline containing 0.05 % BSA. Control mice were given 10  $\mu\text{g}$  of PVP in saline containing BSA. (n = 5, mean  $\pm$  SE)

#### 第四節 小括

本章では高分子バイオコンジュゲーションのシステムアップに向けて、新たな機能・特性の付与が可能な新規修飾高分子の開発を行った。PEG は構造上官能基が乏しく、新たな DDS 機能を付与することは困難である。それに対して PVP は、PEG と同様に日本薬局方収載品であり、安全性の確立された高分子であるうえ、ラジカル重合により簡便に合成でき、種々の分子量に合成可能である。また、ラジカル共重合により、種々の側鎖を持つ PVP 誘導体を合



成することで、反応性の官能基の導入や、親水-疎水バランス、カチオン-アニオンバランスといった修飾分子の物理化学特性、官能基特性の制御が可能となり、その結果、薬物の種類や目的に適した生体内動態制御が達成でき得ると考えられる。

まず PVP の幹高分子としての有用性を評価するため、PEG-IL-6 の場合と同様に片末端活性化型、平均分子量 6,000 の PVP を用いて PVP-IL-6 の効果を検討した。in vitro の修飾率-活性相関は PEG5K とほぼ同様の傾向を示した。これは PVP が PEG と分子量がほぼ同じであり非電荷、両親媒性といった PEG と類似した性質を有するため、in vitro においては同様なバイオコンジュゲート特性を示したものと考えられる。また、in vivo 血小板増加作用は PVP-IL-6 と PEG-IL-6 は同等の効果を示したことから、PVP は少なくとも PEG と同等のバイオコンジュゲート効果を有することが明らかとなった。最適な分子サイズに関しては PVP-IL-6 の方が大きかったが、これは PVP と PEG の構造上、あるいは物性上の違いによるものと考えられ、詳細を明らかにするためには体内動態等の検討が必要である。PVP-LIF の検討では、血小板増加作用については LIF と IL-6 の作用点は同じであると考えられるが、最適な分子サイズには違いが見られた。これは作用が同じであっても、分子サイズという、必ずしも一つのパラメーターによって in vivo 最適条件が決定されるのではなく、薬物の種類や修飾高分子の構造、修飾率、分子サイズ、体内動態特性、比活性などの総合的なバランスに依存することが示唆された。

本章では、PVP が血中安定性を向上させるのみならず、さらにその上で目的に応じた体内動態特性や標的指向性をはじめとする付加機能をバイオコンジュゲート体に付与し得る、より優れた高分子バイオコンジュゲート化 DDS 製剤の創製を可能にする修飾高分子であることを示した。現在、種々の PVP 誘導体のスクリーニングを行っているが、これまでに腎指向性を有する高分子や、コントロールドリリースし得る高分子など興味深い結果が得られつつある。今後は PVP 誘導体の物理化学的特性や体内動態などの体系的検討を行い、サイトカインの種類や目的に応じた、最適化な修飾高分子を見出す指針を見出していかなければならないと考えられる。

## 総括

近年の分子細胞生物学やバイオテクノロジー技術の進歩には目を見張るものがあり、今後益々各種疾病が分子レベルで解明されていくと共に、生理活性蛋白質を有効な医薬品として応用しようとする試みがさらに加速度的に増加していくであろう。しかしながらサイトカインをはじめとする生理活性蛋白質を安全性・有効性が確保された、信頼性の高い次世代医薬品として創出していくためには、まず生理活性蛋白質の生体内不安定性、および作用の多様性を克服し得る創薬技術の開拓が必須となってくる。本来生体においては、サイトカインなどの内因性生理活性蛋白質は、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、生体内挙動特性、比活性を賦与されており、生体内環境との有機的連関を高度に維持しつつ、必要とする生理作用のみを効率的に発揮している。即ち生体は、糖鎖修飾により高度にインテリジェント化された細胞間言語を巧みに制御しつつ、サイトカインネットワークをはじめとする生体の恒常性を維持形成しているのである。このような生体の絶妙な仕組みのもとではじめて、サイトカインなどの生理活性蛋白質はその機能をいかに発揮し得るのである。言うなれば、内因性の生理活性物質を人為的に投与した「薬物分子」と見立てた場合には、これらは糖鎖修飾により薬物治療の最適化を目指した生理活性蛋白質の DDS を見事なまでに実現している。このような生体の巧妙な仕組みこそ、我々が目指さなければならない未来の新しい DDS にほかならない。言い換えれば生命現象の天然様式に学んだ薬物治療学・創薬学とも言うべき新たな学問体系、すなわち生体側から観た創薬概念を早急に確立していかなばならないといえる。この点本博士論文で検討したサイトカインの水溶性高分子バイオコンジュゲーションは、生体が本来的に有する不安定な機能因子を比活性を保持したまま、安定化し、インテリジェント化しようとする糖鎖修飾を模倣したテクノロジーとも言えよう。しかしながら本研究におけるサイトカインの高分子バイオコンジュゲーションでは、トライ・アンド・エラーの現象論により、つぶさにバイオコンジュゲーション条件を追求していくことで、ようやく比活性やプロテアーゼ抵抗性を確保し、望ましい体内挙動特性を付与することで、はじめて目的治療作用を効率よく引き出し得たに過ぎない。今後本研究で追求した生理活性蛋白質の安定化と作用の選択性付与、さらには修飾部位制御

法、機能導入可能な修飾高分子に関する概念・テクノロジーを出発点として、さらにバイオコンジュゲーションを進化させていくためには、糖鎖修飾の様式や修飾部位制御法の確立、糖鎖の生理的機能やその意義と、修飾高分子の諸性質やその体内挙動との連関、水溶液中での立体構造の把握など、さらなる生命科学や物理化学、創薬学、薬物動力学の伸展が要求されてくる。従って高分子バイオコンジュゲーションのさらなる進化のためにとどまらず、我々は今後ますます、生体の有する巧妙なメカニズムから、ドラッグデリバリーシステム（DDS）の方法論を学び、一方では学際的な科学技術を駆使することで次世代のDDSを構築していくべきであろう。

## 結論

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。

1. IL-6 を至適条件で 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。また、その効果は血中滞留性、組織移行性、安定性、比活性をはじめとする、諸因子の有機的バランスに依存していることが明らかとなった。
2. PEG バイオコンジュゲーションにより、サイトカインの投与量の大幅削減、および副作用発現に関わる組織への分布を抑制するという、体内動態制御が可能となり、その結果、サイトカインの多様な in vivo 生理作用の中から目的とする治療作用をより選択的に増強し得ることが示唆された。
3. DMMA<sub>n</sub> 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た。また、高分子バイオコンジュゲーションに修飾制御法を導入することで、サイトカインの有する作用をより効率的に発揮させ得ることが明らかとなった。
4. PEG よりもさらに緻密な動態制御、および機能付与が可能な新規修飾高分子として PVP が有用であることを見出した。In vivo において PVP は PEG と少なくとも同等のバイオコンジュゲート効果を有したことから、さらなる DDS 機能の付与を行うための幹高分子として、PVP を提示し得たものと思われる。

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とするとともに、今後のさらなるサイトカインの DDS におけるシステムアップの方向性を提示した。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授、真弓忠範先生に衷心より謝意を表します。

また、本研究にあたり、種々御指導を頂きました大阪大学大学院薬学研究科講師、中川晋作先生、助手、久保一義先生に深謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始あたたかい御指導・御鞭撻ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科助手、堤 康央先生に心より御礼申し上げます。

本研究に関し、種々御指導・御鞭撻・御協力を頂きました、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、平野 隆先生、聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター、五十嵐理慧先生、神戸学院大学薬学部、三宅正治先生に深謝いたします。

IL-6、LIF、G-CSF を御供与頂きました中外製薬株式会社に感謝いたします。また、TNF- $\alpha$ を御供与頂きました持田製薬株式会社および林原生物化学研究所に感謝いたします。

そして本研究を遂行するにあたり多大な御協力を頂きました、紀平哲也修士、金田喜久博士、鎌田春彦修士、小泉桂一修士、若井由紀子修士、山本陽子修士、松井順二修士、石川智世至学士、渡邊将規学士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野の皆様心より感謝致します。

最後に、在学中の経済的援助を賜りました、日本育英会ならびに日本学術振興会に感謝いたします。

## 引用文献

- 1 ) Miwa S., Shibata A., Kaneko T. *Acta. Haematol.* **87**: 22-28, 1992.
- 2 ) Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Chang A.E., Avis F.P., Leitman S., Linehan W.M., Robertson C.N., Lee R.E., Rubin J.T., Seipp C.A., Simpson C.G., White D.E. *New Engl. J. Med.* **316**: 889-897, 1987.
- 3 ) Grimfors G., Merk K., Tangen J.M., Wingvist I. *Leuk. Lymphoma.* **11**: 221-228, 1993.
- 4 ) Scarffe J. H., Kamthan A.: *Cancer Surv.* **9** 115-130, 1990.
- 5 ) Marty M. *Eur. J. Cancer* **30** (Suppl) S20-5, 1994.
- 6 ) Neri B., Fiorelli C., Moroni F., Nicita G., Paoletti M. C., Ponchietti R., Raugei A., Santoni G., Trippitelli A., Grechi G. *Cancer* **73** 3015-3019, 1994.
- 7 ) Mittelman A., Puccio C., Gafney E., Coombe N., Singh B., Wood D., Nadler P., Ahmed T., Arlin Z. *Invest. New Drugs* **10** : 183-190, 1992.
- 8 ) Balkwill, F.R. *Eur. Cytokine Netw.* **5**: 379-385, 1994.
- 9 ) Aulitzky W.E., Huber C., Peschel C. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **101**: 221-226, 1993.
- 10 ) Jayson G.C., Middleton M., Lee S.M., Ashcroft L., Thatcher N. *Br. J. Cancer* **78**: 366-369, 1998.
- 11 ) Reddy S.P., Harwood R.M., Moore D.F., Grimm E.A., Murray J.L., Vadhan-Raj S. *J. Immunother.* **20**: 79-87, 1997.
- 12 ) Donohue J.H., Rosenberg S.A. *J. Immunol.* **130**: 2203-2208, 1983.
- 13 ) Tanaka H., Tokiwa T. *Cancer Res.* **50**: 6615-6619, 1990.
- 14 ) Manda T., Nishigaki F., Mori J., Shimomura K. *Cancer Res.* **48**: 4250-4255, 1988.

- 15 ) Kimura K., Tagucui T., Urushizaki I., Ohno R., Abe O., Furue H., Hatton T., Ichihashi H., Inoguchi K., Majima H., Niitani H., Ota K., Saito T., Suga S. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **20**: 223-229, 1987.
- 16 ) Abuchowski A., Van E. S. T., Palczuk N. C., Davis F. F. *J. Biol. Chem.* **252**: 3578-3581, 1977.
- 17 ) Kamisaki Y., Wada H., Yagura T., Matsushima A., Inada Y. *J. Pharmac. Exp. Therap.* **216**: 410-414, 1981.
- 18 ) Pyatak P. S., Abuchowski A., Davis F. F. *Res. Commun. Chem. Patol. Pharmacol.* **15**: 113-127, 1980.
- 19 ) Abuchowski A., Gazo G. M., Verhoest C. R. Jr., Van E. S. T., Kafkewitz D., Nucci M. L., Viau A. T., Davis F. F. *Cancer Biochem. Biophys.* **7**: 175-186, 1984.
- 20 ) Tabata Y., Uno K., Ikada Y., Muramatsu S. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**: 303-308, 1992.
- 21 ) Balemans L.T.M., Mattijssen V., Steerenberg P.A., Van Driel B.E.M., De Mulder P.H.M., Den Otter W. *Cancer Immunol. Immunother.* **37**: 7-14, 1993.
- 22 ) Knusli C., Delgado C., Malik F., Domine M., Tejedor M.C., Ilvine A.E., Fisher D., Francis G.E. *Br. J. Hematology* **82**: 654-663, 1992.
- 23 ) *Med. Lett. Drugs Ther.* **32**: 87-88, 1990.
- 24 ) Burnham N. L. *Am. J. Hosp. Pharm.* **51**: 210-218, 1994.
- 25 ) Hershfield M. S. *Immunodeficiency* **4**: 93-97, 1993.
- 26 ) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kanamori T., Nakagawa S. Mayumi T. *Br. J. Cancer* **71**: 963-968, 1995.
- 27 ) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kamada H., Kihira T., Kaneda Y., Kanamori T., Nakagawa S. Mayumi T. *Br. J. Cancer* **74**: 1090-1095, 1996.
- 28 ) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kamada H., Kanamori T., Nakagawa S., Kaneda Y. Mayumi T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**: 1006-1011, 1996.

- 29 ) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kaneda Y., Kamada H., Kihira T., Nakagawa S., Yamamoto Y., Horisawa Y. Mayumi T. *Jpn. J. Cancer Res.* **87**: 1078-1085, 1996.
- 30 ) Kaneda Y., Yamamoto Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y., Hirano T. Mayumi T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **239**: 160-165, 1997.
- 31 ) Kaneda Y., Yamamoto Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Hirano T. Mayumi T. *Cancer Res.* **58**: 290-295, 1998.
- 32 ) Kodaira H., Kaneda Y., Yamamoto Y., Nanba T., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T. *Drug Delivery System* **12**: 431-437, 1997.
- 33 ) Kaneda Y., Tsunoda S., Kamada H., Yamamoto Y., Kodaira H., Tsutsumi Y., Mayumi T. submitted.
- 34 ) Hoagland H. C. *Semin. Oncol.* **9**: 95-102, 1982.
- 35 ) Bacigalupo A., Hows J., Gluckman E., Nissen C., Marsh J., Van Lint M. T., Congiu M., De Planque M. M., Ernst P., McCann S., Raghavachar A., Frickhofen N., Würsh A., Marmont A. M., Gordon-Smith E. C. *Br. J. Haematol.* **70**: 177-182, 1988.
- 36 ) Ishibashi T., Kimura H., Shikama Y., Uchida T., Kariyone S., Hirano T., Kishimoto T., Takatsuki F., Akiyama Y. *Blood* **74**: 1241-1244, 1989.
- 37 ) Nagasawa T., Orita T., Matsushita J., Tsuchiya M., Neichi T., Imazeki I., Imai N., Ochi N., Kanma H., Abe T. *FEBS Lett.* **260**: 176-178, 1990.
- 38 ) Waring, P. Wall D., Dauer R., Parkin D., Metcalf D. *Br. J. Haematol.* **83**: 80-87, 1993.
- 39 ) Metcalf D., Nicola, N.A. Gearing D.P. *Blood* **76**: 50-56, 1990.
- 40 ) Koike K., Nakahata T., Takagi M., Kobayashi T., Ishiguro A., Tsuji K., Naganuma K., Okano A., Akiyama Y., Akabane T. *J. Exp. Med.* **168**: 879-890, 1988.
- 41 ) Schrezenmeimer H., Marsh J.C.W., Stromeyer P., Müller H., Heimpel H., Gordon-Smith E.C., Raghavachar A. *Br. J. Haematol.* **90**: 283-292, 1995.



- 42 ) Gordon M.S., Nemunaitis J., Hoffman R., Paquette R.L., Rosenfield C., Manfreda S., Isaacs R., Nimer S.D. *Blood* 85: 3066-3076, 1995.
- 43 ) Ishibashi T., Kimura H., Shikama Y., Uchida T., Kariyone S., Hirano T., Kishimoto T., Takatsuki F., Akiyama Y. *Blood* 74: 1241-1244, 1989
- 44 ) Weissenbach J., Chernajovsky Y., Zeevi M., Shulman L., Soreq H., Nir U., Wallach D., Perricaudet M., Tiollais P., Revel M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 7152-7156, 1980.
- 45 ) May L. T., Helfgott D. C., Sehgal P. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8957-8961, 1986.
- 46 ) Hirano T., Taga T., Nakano N., Yasukawa K., Kashiwamura S., Shimizu K., Nakajima K., Pyun K.H., Kishimoto T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 5490-5494, 1985.
- 47 ) Haegeman G., Content J., Volckaert G., Derynck R., Tavernier J., Fiers W. *Eur. J. Biochem.* 159: 625-632, 1986.
- 48 ) Van Damme J., Opdenakker G., Simpson R.J., Rubira M.R., Cayphas S., Vink A., Billiau A., Van Snick J. *J. Exp. Med.* 165: 914-919, 1987.
- 49 ) Van Snick J., Cayphas S., Szikora J.P., Renauld J.C., Van Roost E., Boon T., Simpson R.J. *Eur. J. Immunol.* 18: 193-197, 1988.
- 50 ) Gauldie J., Richards C., Harnish D., Lansdrop P., Baumann H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7251-7255, 1987.
- 51 ) Andus T., Geiger T., Hirano T., Northoff H., Ganter U., Bauer J., Kishimoto T., Heinrich P.C. *FEBS Lett.* 221: 18-22, 1987.
- 52 ) Shabo Y., Lotem J., Rubinstein M., Revel M., Clark S.C., Wolf S.F., Kamen R., Sachs L. *Blood* 72: 2070-2073, 1988.
- 53 ) Hirano T., Kishimoto T. *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol. 95 / I Peptide Growth Factors and Their Reports: 633-665, Springer-Verlag, 1990.
- 54 ) Zilberstein A., Ruggieri R., Korn J. H., Revel M. *EMBO J.* 5: 2529-2537, 1986.

- 55 ) Sehgal P. B., Grienger G., Tosata G. *Ann. NY Acad. Sci.* 577: 1-583, 1989.
- 56 ) Yoshizaki K., Nishimoto N., Matsumoto K., Tagoh H., Taga T., Deguchi Y., Kuritani T., Hirano T., Hashimoto K., Okada N., Kishimoto T. *Cytokine* 2: 381-387, 1990.
- 57 ) Horii Y., Muraguchi A., Iwano M., Matsuda T., Hirayama T., Yamada H., Fujii Y., Dohi K., Ishikawa H., Ohmoto Y., Yoshizaki K., Hirano T., Kishimoto T. *J. Immunol.* 143 3949-3955, 1989.
- 58 ) Koike K., Nakahata T., Takagi M., Kobayashi T., Ishiguro A., Tsuji K., Naganuma K., Okano A., Akiyama Y., Akabane T. *J. Exp. Med.* 168: 879-890, 1988.
- 59 ) Navarro S., Mitjavila M.T., Katz A., Doly J., Vainchenker W. *Exp. Hematol.* 19: 11-17, 1991.
- 60 ) Navarro S., Debili N., Couedic J.P.L., Klein B., Breton-Gorius J., Doly J., Vainchenker W. *Blood* 77: 461-471, 1991.
- 61 ) Tavassoli M., Aoki M. *Blood Cells* 15: 3-14, 1989.
- 62 ) Pedersen N.T. *Scand. J. Haemat.* 13: 225-231, 1974.
- 63 ) Scurfield G., Radley J.M. *Am. J. Hemtol.* 10: 285-296, 1981.
- 64 ) Lichtman M.A., Chamberlain J.K., Simon W., Santillo P.A. *Am. J. Hematol.* 4: 303-312, 1978.
- 65 ) Weber J., Yang J.C., Topalian S.L., Parkinson D.R., Schwartzentruber D.S., Ettinghausen S.E., Gunn H., Mixon A., Kim H., Cole D., Levin R., Rosenberg S.A. *J. Clin. Oncol.* 11: 499-506, 1993.
- 66 ) Harris J.M. *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical applications*, Plenum Press, New York, U.S.A., 1992.
- 67 ) Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T. *Eur. J. Immunol.* 18: 951-956, 1988.
- 68 ) Zalipsky S., Seltzer R., Menon-Rudolph S. *Biotechnol. Appl.*

*Biochem.* **15**: 100-114, 1992.

- 69 ) Yoshimoto T., Nishimura H., Saito Y., Sakurai K., Kamisaki Y., Wada H., Sako M., Tsujino G., Inada Y. *Jpn. J. Cancer Res.* **77**: 1264-1270, 1986.
- 70 ) Attasi M.Z., Manshour T. *J. Protein Chem.* **10**: 623-627, 1991.
- 71 ) Partis M.D., Griffiths D.G., Roberts G.C., Beechey R.B. *J. Protein Chem.* **2**: 263-277, 1983.
- 72 ) Fontaine V., Savino R., Arcone R., De Wit L., Breakenhoff J.P.J., Content J., Ciliberto G. *Eur. J. Biochem.* **211**: 749-755, 1993.
- 73 ) Takaku F. *Nippon Rinsyo* **46**: 1105-1111, 1988.
- 74 ) Ogawa M., Masaoka T., Mizoguchi H., Takaku F., Nakashima M. *Gan To Kagaku Ryoho* **17**: 365-373, 1990.
- 75 ) Mayer P., Geissler K., Valent P., Ceska M., Bettelheim P., Liehl E. *Exp. Hematol.* **19**: 688-696, 1991.
- 76 ) Suematsu S., Matsuda T., Aozawa K., Akira S., Nakano N., Ohno S., Miyazaki J., Yamamura K., Hirano T., Kishimoto T. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 7547-7551, 1989.
- 77 ) Veldhuis G.J., Willemse P.H., Mulder N.H., Limburg P.C., De Vries E.G. *Leuk. Lymphoma* **20**: 373-379, 1996.
- 78 ) D'Hondt V., Humblet Y., Guillaume T., Baatout S., Chatelain C., Berliere M., Longueville J., Feyens A.M., de Greve J., Van Oosterom A. *Blood* **85**: 2347-2353, 1995.
- 79 ) Marchalonis J.J. *Biochem. J.* **113**: 299-305, 1969.
- 80 ) Takatsuki F., Okano A., Suzuki C., Miyasaka Y., Hirano T., Kishimoto T., Ejima D., Akiyama Y. *Cancer Res.* **50**: 2885-2890, 1990.
- 81 ) Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T. *Drug Delivery System* **10**: 75-84, 1995.
- 82 ) Taga T., Hibi M., Hirata Y., Yamasaki K., Yasukawa K., Matsuda T., Hirano T., Kishimoto T. *Cell* **58**: 573-581, 1989.

- 83 ) Kishimoto T., Akira S., Taga T. *Science* **258**: 593-597, 1992.
- 84 ) Ehlers M., Grotzinger J., deHon F.D., Mullberg J., Brakenhoff J.P., Liu J., Wollmer A., Rose-John S. *J. Immunol.* **153**: 1744-1753, 1994.
- 85 ) Rose-John S., Schooltink H., Lenz D., Hipp E., Dufhues G., Schmitz H., Schiel X., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P.C. *Eur. J. Biochem.* **190**: 79-83, 1990.
- 86 ) Taga T. *Crit. Rev. Immunol.* **11**: 265-280, 1992.
- 87 ) Falus A., Taga T., Hibi M., Murakami M., Kishimoto T. *Cytokine* **4**: 495-499, 1992.
- 88 ) 血小板輸血、その適応と問題 慶応医学 **58**: 635-649, 1981.
- 89 ) Hirano T., Todoroki T., Kato S., Yamamoto H., Caliceti P., Veronese F., Maeda H., Ohashi S. *J. Controlled Release* **28**: 203-209, 1994.
- 90 ) van Ostade X., Tavernier J., Prange T., Fiers W. *EMBO J.* **10**: 827-836, 1991.
- 91 ) Stocks S.J., Jones A.J., Ramey C.W., Brooks D.E. *Anal. Biochem.* **154**: 232-234, 1986.
- 92 ) Yamazaki S., Onishi E., Enami K., Natori K., Kohase M., Sakamoto H., Tanouchi M., Hayashi H. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **39**: 105-118, 1986.
- 93 ) Shirafuji N., Asano S., Matsuda S., Watari K., Takaku F., Nagata S. *Exp. Hematol.* **17**: 116-119, 1989.
- 94 ) Young D.C., Zhan H., Cheng Q.L., Hou J., Matthews D.J. *Protein Sci.* **6**: 1228-1236, 1997.
- 95 ) Nishikawa M., Hirabayashi H., Takakura Y., Hashida M. *Pharm. Res.* **12**: 209-214, 1995.
- 96 ) Fujita T., Nishikawa M., Tamaki C., Takakura Y., Hashida M., Sezaki H. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**: 971-978, 1992.
- 97 ) Goodson R.J., Katre N.V. *Biotechnology (N.Y.)* **8**: 343-346, 1990.

- 98 ) Robinson B.V., Sullivan F.M., Borzelleca J.F., Schwartz S.L. PVP : A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone (Povidone), Lewis Publishers, U.S.A., 1990.
- 99 ) Gregg R.A., and Mayo F.R. *Faraday discuss.* 2: 328- , 1947.
- 100) Tomida M., Yamamoto-Yamaguchi Y., Hozumi M. *J. Biol. Chem.* 259: 10978-10982, 1984.
- 101) Cooper R. J., Gordon M. S., Weber J., Hoffman R. *Exp. Hematol.* 21 (Suppl): 1172, 1993.
- 102) Weber J., Yang J.C., Topalian S.L., Parkinson D.R., Schwartzentruber D.S., Ettinghausen S.E., Gunn H., Mixon A., Kim H., Cole D., Levin R., Rosenberg S.A. *J. Clin. Oncol.* 11:499-506, 1993.
- 103) D'Hondt V., Humbelt Y., Guillaume Th., Baatout S., Chatelain C., Berliere M., Longueville J., Feyens A. M., De Greve J., Van Oosterom A., Von Graffenried B., Donnez J., Symann M. *Blood* 85: 2347-2353, 1995.
- 104) Mule J.J., Marcus S.G., Yang J.C., Weber J.S., Rosenberg S.A. *Res. Immunol.* 143: 777-779, 1992.
- 105) Gough N.M., Gearing D.P., King J.A., Willson T.A., Hilton D.J., Nicola N.A., Metcalf D. *Proc. Natl. Acd. Sci.* 85: 2623-2627, 1988.



