

Title	薬物治療の最適化を目指した次世代バイオコンジュゲートDDSの開発に関する研究
Author(s)	山本, 陽子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43366
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山本陽子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 16966 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	薬物治療の最適化を目指した次世代バイオコンジュゲート DDS の開発に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範 (副査) 教授 八木 清仁 教授 前田 正知 教授 東 純一

論文内容の要旨

ポストゲノム新時代を迎え、新たな蛋白質の機能解明が進むにつれ、それら生理活性蛋白質を有効な医薬品として適用しようとするアプローチが、今後ますます増大するものと考えられる。しかし、サイトカイン等の過去の多くの事例に見られるように、これら生理活性蛋白質は体内安定性に乏しい為、十分な治療効果を得る為には大量頻回投与を余儀なくされ、重篤な副作用を招いてしまい、その臨床応用は著しく制限されている。その上これら生理活性蛋白質は多様な生理作用を有する為、実際に医薬品として用いるには目的とする治療作用のみを選択的に引き出し得る適切なドラッグデリバリーシステム(DDS)の確立が必要となってくる。我々はこれまで、これらの問題を解決するアプローチとして、生理活性蛋白質に水溶性高分子を結合させるバイオコンジュゲーションに着目してきた。バイオコンジュゲーションは、腎糸球体濾過を抑制し、蛋白分解酵素からの攻撃を回避する事によって、体内安定性を飛躍的に向上させる事が出来る。しかし一方で、活性中心のアミノ酸残基が修飾されたり、修飾高分子が形成する立体障害によりレセプターとの結合が阻害されるため、比活性の大幅な低下を招いてしまう。その為、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の多くは、低分子を基質とする酵素蛋白質を中心としたものであった。これらの問題点をふまえ我々は、腫瘍壊死因子(TNF- α)などサイトカインのバイオコンジュゲーションを試み、最適の修飾高分子を選択した上で、修飾率-分子サイズ-比活性等の相関を詳細に検討し、最適バイオコンジュゲーション条件を見出す事で、生体内安定性を改善し、さらに副作用を伴う事なく治療作用のみを効率よく引き出し得ることを見出している。従って、バイオコンジュゲート DDS は生理活性蛋白質に、有効性、安全性という医薬品の価値を与える創薬技術になり得るものと期待される。しかし、バイオコンジュゲート DDS を様々な蛋白性薬物に適用し得る次世代創薬技術としてシステムアップしていくには、1) 修飾部位制御法の開発、2) 個々の薬物の諸性質やバイオコンジュゲーションの目的に応じた修飾高分子の選択と設計などが必須となってくる。すなわち、まず1)により、これまでバイオコンジュゲート DDS の適用例が一部の酵素蛋白質に限定されてきた最大の原因である比活性低下を防ぐ必要がある。さらに2)によってターゲティング能等を有する修飾高分子をバイオコンジュゲート DDS に適用する事で、薬物の体内挙動をより厳密に制御し、目的治療作用発現に適した体内挙動特性を付与したうえで副作用発現組織への移行を抑制する事によって、作用の選択性付与をより確実にする必要がある。そこで申請者はまず、TNF- α をモデル蛋白質として活性低下を回避し得る新たな部位特異的バイオコンジュゲーション法の開発を行った。これまで修飾部位を制御し比活性低下を回避する方法は、システインをターゲットとしたバイオコンジュゲーション法が

唯一のものであった。しかしこの方法では、遊離のチオール基を活性発現に関与しない部位に導入した変異体の作製が必須となるが、活性を保持した変異体を作製するのが困難であるうえ、十分な収率で変異体を作製出来ないといった多くの問題を抱えている。さらに活性を保持した変異体を作製でき、修飾部位を制御する事で活性低下を回避したとしても、バイオコンジュゲーション効率の低さから、十分なバイオコンジュゲート体を作製出来ない為、医薬品化は断念されている。従って、比活性低下を回避し得る効率の良い新たな部位特異的バイオコンジュゲーション法の開発が必要とされている。一方これまで汎用されてきた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、アミノ基への結合はランダムである為、活性発現に重要なリジン残基をも修飾されてしまい活性低下を避ける事は出来ないが、反応効率の点では最も優れている。従って、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で、修飾部位を制御する方法論を確立出来れば、効率の良い新たな部位特異的バイオコンジュゲーション法が確立出来るものと期待される。そこでまず、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において、修飾部位を制御する第一段階のアプローチとして、PH可逆的なアミノ基保護試薬ジメチル無水マレイン酸 (DMMA_n) の利用を試みた。その結果予め DMMA_n で TNF- α のアミノ基を保護しておく事で、活性発現に重要なリジン残基を保護し、比活性低下を回避出来る事が判明した。しかし、DMMA_n のアミノ基への結合はランダムである事から次に、より厳密に修飾部位を制御する方法論の確立を目指した。TNF- α は活性発現に N 末端側は重要でないと考えられている事から、活性を保持したままリジン残基を欠損させた変異体を作製する事で、活性発現に重要なリジン残基への修飾を防ぎ、修飾部位を N 末端に限定すれば、活性低下を回避出来ると考えられる。このような方法で修飾部位を制御するには、まず、簡便に活性を保持したリジン欠損変異体を作製する方法論の確立が必要とされる。そこでファージディスプレイシステムを利用する事で、目的とする変異体の迅速かつ網羅的なスクリーニング法の確立を試みた。TNF- α のリジン残基をランダムなアミノ酸に置換したファージライブラリーを作製し、レセプターや中和抗体に対してパニングを行った結果、活性を損なう事なく全てのリジン残基が他のアミノ酸に置換された変異体の作製に成功した。さらに活性が約 3 倍に増強されている変異体も作製出来た事から、ファージディスプレイ法を利用したスクリーニングにより、迅速かつ網羅的なスクリーニングが可能となり、種々の有効な変異体の作製が簡便に行える事が示唆された。次に、リジン残基が全て置換された TNF- α 変異体を用いて部位特異的バイオコンジュゲーションを試みた。その結果、修飾部位を N 末端に限定する事により、*in vitro* での比活性低下を回避する事が可能となり、さらに *in vivo* においても、副作用を大幅に軽減したうえで、効率よく治療効果のみを引き出せる事が明らかとなった。従って、ファージディスプレイシステムを利用したスクリーニング法により、活性を保持したリジン欠損変異体を簡便に作製する事で、様々な生理活性蛋白質に対して部位特異的なバイオコンジュゲーションが可能となり、その医薬品的価値を引き出せるようになるものと期待された。一方、機能性修飾高分子によるバイオコンジュゲート体のより精密な体内動態制御を目指し、我々の研究室で開発した腎指向性修飾高分子、DMMA_n 導入ポリビニルピロリドン (PVP) のバイオコンジュゲート DDS への応用を試みた。DMMA_n 導入 PVP を SOD のバイオコンジュゲーションに適用したところ、最適のバイオコンジュゲート体では約 20% が腎臓に集積し、DMMA_n 導入 PVP が SOD などの蛋白性薬物の体内動態も制御し得る事が判明した。今後、これらのアプローチを統合していく事で、21 世紀の薬物治療を担う次世代バイオコンジュゲート DDS が確立出来るものと期待される。

論文審査の結果の要旨

サイトカインなどの生理活性蛋白質は、極めて体内安定性に乏しいことにより、臨床応用する際には大量頻回投与を余儀なくされ、副作用を呈してしまうために、その臨床応用は極度に制限されている。著者らの研究室では、従来よりこれらの問題を解決する適切なドラッグデリバリーシステム (DDS) として、生理活性蛋白質に水溶性高分子を結合させるバイオコンジュゲーションに着目してきた。しかし、バイオコンジュゲーションは体内安定性を飛躍的に向上させる事が出来る一方で、活性中心部位のアミノ酸残基の修飾や、蛋白質に結合した修飾高分子鎖が形成する立体障害によってレセプター・リガンド結合が阻害される事によって、比活性の大幅な低下を招いてしまう。従って、バイオコンジュゲート DDS を薬物治療の最適化を充たす創薬テクノロジーとしてシステムアップしていくためには、

修飾部位を制御し活性低下を回避し得る新たな方法論の確立が必要となってくる。そこで著者は TNF- α をモデル蛋白質として用い、アミノ基をターゲットとした部位特異的バイオコンジュゲーション方法の開発を試み、以下に示す成果を得た。

1) リジン残基を置換したフェージライブラリーを作製し、活性を保持した変異体をスクリーニングする方法論を確立する事により、簡便かつ短期間に活性を保持したまま、リジン残基が他のアミノ酸に置換された mutant TNF- α の作製に成功した。

2) フェージディスプレイシステムを利用したスクリーニング法により、活性が増強された mutant TNF- α の作製にも成功し、このスクリーニング法を利用する事で、種々の有効な変異体の創製が簡便に行えることが示された。

3) リジン欠損 mutant TNF- α を用いて部位特異的なバイオコンジュゲーションを行う事により、バイオコンジュゲーション法の問題点であった比活性低下を回避する事に成功した。

4) 部位特異的なバイオコンジュゲーション法を用い、比活性低下を回避する事によって、*in vivo*においても、より効果的に治療効果を引き出し得る事が示された。

以上、フェージディスプレイシステムを駆使し、活性を保持したリジン欠損変異体を簡便かつ網羅的にスクリーニングする方法を確立する事により、アミノ基をターゲットとした部位特異的なバイオコンジュゲーションを可能とした。さらにそれによって、比活性低下を回避する事で、より有効なバイオコンジュゲート体を作製し得る事を示している点、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものとする。