

Title	糖鎖構造改変による長寿命型組織プラスミノゲンアクチベーターの開発に関する研究
Author(s)	青木, 昇一
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44423">https://hdl.handle.net/11094/44423</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</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	あおきしょういち 青木 昇 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 17437 号
学位授与年月日	平成 15 年 2 月 14 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	糖鎖構造改変による長寿命型組織プラスミノゲンアクチベーターの開発に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 東 純一 (副査) 教授 田中 徹明 教授 前田 正知 教授 山元 弘

### 論文内容の要旨

組織プラスミノゲンアクチベーター (Tissue-type Plasminogen Activator, t-PA) は、血管内においてフィブリン塊上で選択的にプラスミノゲンをプラスミンに変換するセリンプロテアーゼインヒビターであり、臨床的にも急性心筋梗塞症などに適用されている。t-PA は一次構造が finger (F) domain、growth factor (G) domain、kingle 1 (K1) domain、kingle 2 (K2) domain 及び catalytic (or protease (P)) domain から成る分子量約 70,000 の糖蛋白質である。また、Asn 117 に高マンノース型糖鎖が、Asn184 及び Asn448 に複合型糖鎖が結合している。これら糖鎖に関して、Asn 117、Asn 184 及び Asn 448 の 3ヶ所にある Type I 及び、Asn 117 と Asn 448 の 2ヶ所にある Type II の 2種のバリエーションが存在する。t-PA は既存の血栓溶解剤であるウロキナーゼ及びストレプトキナーゼとは異なり、フィブリンに対する特異的な親和性を有している点で優れているが、血中半減期が短いため、有効血中濃度を得るには大量投与する必要があり、結果として出血などの副作用を招く恐れがある。

近年、より血中半減期が長い t-PA として、t-PA の構造を改変した数種の mutant t-PA (以下 mt-t-PA と略す) が開発されているが、構造改変により、活性やフィブリン親和性が低下し、必ずしも満足出来るものではなかった。そこで我々は、活性やフィブリン親和性の低下の心配が少ない糖鎖を改変させることにより、有用性の高い t-PA の開発を目指した。特に、t-PA が有している 3つの糖鎖のうち、Asn 117 に結合している高マンノース型糖鎖が、t-PA の肝消失過程において重要な働きをすることに着目し、遺伝子工学的手法を用いて Asn 117 を Gln 117 に置換することにより、この糖鎖を除去させた Gln 117 t-PA を作製した。本研究では、血栓溶解剤としての有用性を確認するため、体内動態及び薬理作用に関して、Gln 117 t-PA を wild type t-PA (以下 WT t-PA) と比較した。まず、Gln 117 t-PA が血中において、WT t-PA と比べて、持続性が向上していることをラットに単回または持続静脈内投与した時の体内動態により明らかにした。また、この高マンノース型糖鎖除去によるクリアランスの低下が、血中インヒビターとの結合や尿・糞中への排泄ではなく、肝への取り込みの減少に由来していることも明らかにした。次に、t-PA の特徴であるフィブリン親和性に与える糖鎖の影響を検討したところ、Asn 117 及び Asn 184 に結合した糖鎖が各々、F 及び K2 domain 依存性の結合を阻害しており、Gln 117 t-PA が WT t-PA に比べて高いフィブリン親和性を有していることを明らかにした。さらに、血栓溶解作用をウサギ肺塞栓モデルにより評価したところ、Gln 117 t-PA が WT t-PA に比べて血栓溶解作用において優れており、また血漿中濃度と血栓溶解作用との関係について調べた結果、血栓溶解作用に対する有効血漿中濃度が存在し、この濃度範囲における AUC (AER) が投与方法にかかわらず、本薬理効果

の指標として有用であること示すとともに、Gln 117 t-PA の血栓溶解作用における WT t-PA に対する優位性は、この AER の差に起因していることを見出した。そして、製造過程で認められる Gln 117 t-PA の糖鎖数及び鎖長の差異に由来する 4 種のバリエーションについて、単回静脈内投与時のラット血中動態を調べて、Asn 184 に結合した糖鎖が t-PA のクリアランスを減少させ、N 末端のペプチド Gly-Ala-Arg が逆に増加させることを明らかにした。前者は、Asn 184 結合糖鎖の LRP による t-PA クリアランス機構の阻害と考えられたが、後者の機構については不明であるが、プロセッシング段階の中間体である L 鎖が有している N 末端ペプチドが、体内動態にこのように大きな影響を与えることは極めて興味深いものである。最後に、ヒト血中動態試験により、Gln 117 t-PA がヒトにおいても、WT t-PA に比べてより高い血中持続性を有していることを明らかにした。以上、t-PA の血中動態に与える影響を主に糖鎖について検討し、血栓溶解作用と血中動態との関係も明確にして、Gln 117 t-PA の臨床における優位性を示唆する結果を得た。

### 論文審査の結果の要旨

血栓溶解作用を有する組織プラスミノゲンアクチベーター (Tissue-type Plasminogen Activator、t-PA) は、既存の血栓溶解剤とは異なりフィブリンに対する特異的な親和性を有している。しかし、血中半減期が短いため大量投与が必要となり、副作用発現を避けるのが困難であった。これまでに t-PA の血中濃度の持続性を向上させるため数種の mutant t-PA (mt-PA) が開発されたが、何れも構造改変に起因する活性やフィブリン親和性の低下が避けられず、満足出来るものではなかった。そこで、有用性の高い mt-PA の開発を目指し、t-PA の肝消失過程において重要な働きをする高マンノース型糖鎖を除去した Gln 117 t-PA が作製された。本研究では、Gln 117 t-PA の血栓溶解剤としての有用性を確認するため、体内動態及び薬理作用を wild type t-PA (以下 WT t-PA) と比較し、臨床的意義を示すと同時に今後の血栓溶解剤の開発における有益な知見を得ている。すなわち、Gln 117 t-PA は WT t-PA と比べて血中濃度の持続性が向上し、フィブリン親和性が高く血栓溶解作用においても優れていることが検証された。また、糖鎖だけではなく、わずか 3 つのアミノ酸から成る N 末端のペプチドが t-PA の血中動態に影響を与えることも明らかにし、高分子タンパクの製造過程で生じるバリエーションに関しても有益な知見を得ている。さらに、ヒトにおいても Gln 117 t-PA が WT t-PA に比べてより高い血中濃度の持続性を有していることを明らかにし、Gln 117 t-PA の臨床における優位性を示した。

以上、本研究では、特定の mt-PA の血栓溶解剤としての有用性を示すと同時に、今後の糖タンパク医薬品の開発に対して有用な知見を得ており、博士 (薬学) の学位を授与するに相応しいものと考えられる。