



Title	蛋白療法の最適化に向けた医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の創製に関する研究
Author(s)	吉岡, 靖雄
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44801">https://hdl.handle.net/11094/44801</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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	吉 岡 靖 雄
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 18643 号
学位授与年月日	平成 16 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	蛋白療法の最適化に向けた医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の創製に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 真弓 忠範  (副査) 教授 馬場 明道 教授 松田 敏夫 教授 東 純一

#### 論文内容の要旨

ポストゲノム新時代を迎え、生理活性蛋白質を有効な医薬品として開発しようとするプロテオーム創薬への期待が高まっている。しかし周知のように、生理活性蛋白質は体内安定性に乏しいため、臨床応用の際には大量頻回投与を余儀なくされ、多くの場合、重篤な副作用を招いてしまっている。また一般にサイトカインなどは、複数種のレセプターを介して多様な *in vivo* 作用を示すため、目的とする治療作用のみならず副作用をも同時に発現してしまう。従ってプロテオーム創薬を推進するためには、上述した問題点を克服し得る創薬テクノロジーの確立が不可欠であり、この創薬テクノロジーは蛋白療法の最適化を目指した Drug Delivery System (DDS) にとって最重要項目と位置付けられる。

従来から世界的に行われてきた、医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の創製は、Kunkel 法といった点突然変異法を利用し、種々蛋白質の構造変異体(アミノ酸置換体)をトライ・アンド・エラーで作製することにより試みられてきたものである。当研究室でもイムノトキシンなどの体内安定性を改善するため、点突然変異法により蛋白質表面の塩基性アミノ酸を中性、酸性アミノ酸といった他のアミノ酸へ置換し、蛋白質の表面電荷を低下させることで(Lowering pI 法)、蛋白質の細網内皮系への取り込み回避や腎排泄濾過の抑制を達成し得ること、その結果これら蛋白質の目的治療作用を効率よく向上し得ることを明らかとしてきた。しかしながら、点突然変異法は膨大な時間、労力を費やすばかりか、作製可能な構造変異体の多様性(種類)にも限界があるなど、期待通りの機能性人工蛋白質は殆ど得られていない。そのため、効率よく、目的の機能性人工蛋白質を設計・創製できる基盤テクノロジーの確立が必須となっている。

一方で、水溶性高分子で蛋白質を修飾するバイオコンジュゲーションは、蛋白質の生体内安定性を高め得る最適の DDS と世界的に認識されており、中でもポリエチレングリコール(PEG)を用いたバイオコンジュゲーション(PEGylation)は数多くの蛋白質へ適用されようとしている。しかし従来までのバイオコンジュゲーション法は、主として N 末端アミノ基やリジンアミノ基へランダムに高分子導入するものであったため、活性発現に重要なリジン残基をも修飾してしまい、著しい比活性低下を招いてしまううえ、得られたバイオコンジュゲート体が分子的、機能的にも不均一になってしまうため、その成功例は限局されている。そのため、21 世紀型創薬としてプロテオーム創薬を推進するためには、部位特異的に効率よく高分子導入でき、高い比活性を有するバイオコンジュゲート体を創製でき

るテクノロジーの確立が待望されている。

以上の観点から本研究では、蛋白療法の最適化に叶う「プロテオーム創薬のための DDS 基盤テクノロジー」の確立を最終目的に、夢の抗癌剤として期待されている TNF- $\alpha$  をモデルとして用い、上述の両テクノロジーのシステム・アップ（最適化）を図った。第一に、ファージ表面提示法を駆使した“医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の迅速創製システム”を最適化することで、全リジン残基が他のアミノ酸に置換され、かつヒト TNF レセプター I (TNFRI) を介した *in vitro* 生物活性がワイルドタイプ TNF- $\alpha$  (wTNF- $\alpha$ ) の 10 倍に向上した Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ -K90R) が初めて創製できた。この mTNF- $\alpha$ -K90R は現存する人工蛋白質中で最強の比活性を有するものである。また mTNF- $\alpha$ -K90R は、マウス TNFRI を介した *in vitro* 比活性は wTNF- $\alpha$  の約 6 倍に上昇していたが、その *in vivo* 抗腫瘍効果は wTNF- $\alpha$  の約 10 倍にも増強されていることが判明した。同時に、その *in vivo* 副作用は顕著に軽減されていたことから、mTNF- $\alpha$ -K90R の癌治療域は wTNF- $\alpha$  の約 13 倍にも拡大していることが明らかとなった。この、治療域拡大は Lowering pl 効果による血中滞留性の向上に起因するものと考えられた。第二に、wTNF- $\alpha$  よりも生物活性に優れた機能性リジン欠損 TNF- $\alpha$ 、mTNF- $\alpha$ -K90R を創製し、N 末端アミノ基への部位特異的バイオコンジュゲーションを初めて可能とすることにより、「活性中心への高分子導入による比活性低下」や「ランダムな高分子導入による分子・機能的不均一性」といった従来までのランダム・バイオコンジュゲーションの致命的欠点を一挙に克服できることを明らかとした。さらにこの独自の部位特異的バイオコンジュゲーションにおける、修飾高分子の分子量・比活性・目的治療効果の連関を評価し、PEG 化 TNF- $\alpha$  の創製条件を最適化することにより、wTNF- $\alpha$  よりも優れた *in vitro* 生物活性を保持した PEG 化体の作製に成功した。PEG 化体が未修飾の野生型蛋白質よりも高い比活性を保持していた例は他に皆無であり、本研究で確立した「機能性人工蛋白質の創製システム」と「部位特異的バイオコンジュゲーション」との融合戦略により初めて達成できたものである。この mTNF- $\alpha$ -K90R の部位特異的モノ PEG 化体は、Lowering pl 効果と PEGylation 効果の相乗作用により、wTNF- $\alpha$  と比較して約 60 倍も優れた治療域を有していることを見出した。現在この部位特異的 PEG 化 mTNF- $\alpha$ -K90R の臨床応用に向けた研究展開を進めると同時に、mTNF- $\alpha$ -K90R などの立体構造解析を試みている。第三に、有効性・安全性に優れた機能性 TNF- $\alpha$  の腫瘍血管特異的な *in vivo* 血管透過性亢進剤としての有用性を示した。

以上、蛋白療法の最適化に叶うプロテオーム創薬のための創薬 (DDS) 基盤テクノロジーの確立を目指し、ファージ表面提示法を駆使した“医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の迅速創出システム”と“部位特異的バイオコンジュゲーションシステム”の融合アプローチを考案・最適化する事に成功した。本研究成果が、21 世紀の蛋白療法の飛躍的進展に貢献できることを期待している。

### 論文審査の結果の要旨

新世紀を迎え、疾病治療に有効な蛋白質を探索・創製しようとするプロテオーム創薬は、今後加速的に進展するものと考えられている。しかしながら、生理活性蛋白質は体内安定性に乏しいため、臨床応用の際には大量頻回投与を余儀なくされ、多くの場合、重篤な副作用を招いてしまっている。従来から医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の創製は、点突然変異法を利用して試みられてきた。しかしながら、本法で作製可能な構造変異体の種類には労力・時間の点で限界があるなど、期待通りの結果は得られていない。そのため、効率よく目的の機能性人工蛋白質を設計・創製できる基盤テクノロジーの確立が急務となっている。一方で、水溶性高分子で蛋白質を修飾するバイオコンジュゲーションは、蛋白質の生体内安定性を高め得る最適の DDS として世界的に評価されており、特にポリエチレングリコール (PEG) を用いたバイオコンジュゲーションは数多くの蛋白質へ適用されようとしている。しかし依然として、バイオコンジュゲーションの成功例は極めて少ない。この最大の原因は、活性発現部位への水溶性高分子導入による致命的な比活性低下と、バイオコンジュゲート化蛋白質の分子的・機能的不均一性にある。そこで著者は、プロテオーム創薬のための DDS 基盤テクノロジーの確立を最終目的に、Wild-type TNF- $\alpha$  (wTNF- $\alpha$ ) よりも比活性が増強し、かつリジン残基が完全に他のアミノ酸に置換された医薬価値に優れた Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  の迅速創製とその有用性評価を行った。次いで、得られたリジン欠損 TNF- $\alpha$  に対する部位特異的 PEGylation の詳細な

条件検討を通じて、癌に対する治療域が飛躍的に拡大した機能化 TNF- $\alpha$  の作製を試みた。その結果、以下の成果が得られた。

1. 全リジン残基が他のアミノ酸に置換され、かつ *in vitro* 活性が飛躍的に向上した Lowering pl 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  (mTNF- $\alpha$ -K90R) を初めて創製した。
2. mTNF- $\alpha$ -K90R は、マウス TNFR1 を介した *in vitro* 比活性は wTNF- $\alpha$  の約 6 倍、*in vivo* 抗腫瘍効果は約 10 倍に増強されている事が判明した。
3. mTNF- $\alpha$ -K90R の N 末端アミノ基への部位特異的バイオコンジュゲーションを行ったところ、元の wTNF- $\alpha$  よりも優れた比活性を保持した PEG 化体の作製に初めて成功した。
4. mTNF- $\alpha$ -K90R の部位特異的モノ PEG 化体 (sp-PEG-mTNF- $\alpha$ -K90R) は、Lowering pl 効果と PEGylation 効果の相乗作用により、wTNF- $\alpha$  と比較して約 60 倍も優れた治療域を有している事を示した。

以上、ファージ表面提示法を駆使した「医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の迅速創製システム」と「部位特異的バイオコンジュゲーションシステム」の融合アプローチを考案・最適化することに成功した。これは蛋白療法の最適化に叶うプロテオーム創薬のための DDS 創薬基盤テクノロジーの確立に極めて大きく貢献するものであり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいと考える。