



Title	ポストゲノム創薬の最適化に向けた細胞内薬物動態制御技術の開発
Author(s)	杉田, 敏樹
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49197
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	すぎ 杉 田 敏 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 21959 号
学位授与年月日	平成 20 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	ポストゲノム創薬の最適化に向けた細胞内薬物動態制御技術の開発
論文審査委員	(主査) 教授 中川 晋作 (副査) 教授 前田 正知 教授 東 純一 教授 土井 健史

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質は、細胞内の mRNA から翻訳された後、細胞質や様々なオルガネラへと正確に輸送されるとともに、翻訳後修飾を受けつつ、最終的に蛋白質間相互作用を介してそれぞれの生理機能を発揮する。このように、蛋白質は局在や相互作用を通じて複雑なネットワークを形成することにより、細胞や組織、個体の恒常性を維持している。従って、疾患を生命体の恒常性が破綻した状態であると捉えるならば、恒常性維持の最上流で機能する細胞内蛋白質を標的とした治療戦略は、疾患の根本的な治療方法になり得る可能性を秘めている。また抗体医薬、サイトカイン、受容体蛋白質等の蛋白質が、様々な難治性疾患に対する特効薬として台頭してきたことも相俟って、21 世紀の創薬研究においては、多彩な生理活性を有するペプチドや蛋白質を疾病治療に有効な医薬品シーズとして積極的に活用していこうとする流れが加速度を増している。しかし、ペプチドや蛋白質といった蛋白性医薬品は、細胞膜透過性や標的蛋白質が局在する特定オルガネラへの移行性に乏しいという致命的欠点を抱えている。従って、細胞内蛋白質を標的とした細胞内薬物療法をポストゲノム時代の新しい治療戦略として確立するためには、薬物を細胞内に効率よく送達した上で細胞内での薬物動態をも緻密に制御可能な新規 Drug Delivery System (DDS) の開発が必須である。以上の観点から、本研究では細胞内移行活性を有する Protein Transduction Domain (PTD) を応用した細胞内 DDS 技術の開発を試みた。細胞内高分子導入キャリアーとしての PTD の細胞内移行特性を精査することで、蛋白性医薬品の細胞内 DDS 製剤化に向けた課題を明らかにすると共に、これらの情報を基にして、ファージ表面提示法を基盤とした改良型 PTD 創出技術の開発、ならびに細胞内ターゲティング技術の確立を図った。

代表的な 4 種類の PTD (Tat、Antp、Rev、VP22) を用いて、細胞内移行特性の比較解析を試みた。はじめに、PTD 自身の細胞内移行特性を細胞内移行活性及び細胞傷害性の観点から評価したところ、Rev や Antp は細胞内移行効率の点では優れているものの安全性に乏しいこと、その一方で安全性に優れた Tat や VP22 は細胞内移行活性が Rev に及ばないことが明らかとなり、既存の PTD では細胞内移行活性と安全性の両立が困難であることが示唆された。さらに、各 PTD の細胞内移行機序を解析したところ、いずれの PTD もエンドサイトーシスの一つであるマクロピノサイトーシスを介して細胞内へと移行し、大部分がエンドソーム小胞内に捕捉されてしまうことが示された。従って、PTD を用いた有効かつ安全な細胞内薬物療法を実現するためには、細胞内移行活性/安全性を両立した PTD の創出と、エンドソーム捕捉性の克服が課題であるものと考えられた。これら PTD の問題点を克服するために、移行活性及び安全性に優れた改変型 PTD の創出、ならびに標的オルガネラへと選択的に薬物を送達させる細胞内ターゲ

ティング技術の確立を試みた。

細胞内移行活性及び安全性を両立した PTD の創出を目指し、ファージ表面提示法を応用した独自の PTD 改良方法の開発を行った。移行活性と安全性のバランスに優れていた Tat をテンプレートとし、細胞内移行活性に重要と考えられているアルギニン以外の 5 個のアミノ酸をランダムに置換した改変体 Tat 提示ファージライブラリを構築した。本ライブラリの中から、細胞内移行活性が向上した改変型 Tat をハイスループットに同定するために、細胞に対する結合親和性に基づく PTD 候補分子の選別と、細胞内でのみ細胞傷害性を発揮する蛋白質合成阻害因子 (Protein Synthesis Inhibition Factor : PSIF) を利用した独自の細胞内移行活性評価を組み合わせた新たなスクリーニング法を考案した。本スクリーニング法を実施したところ、野生型 Tat よりも細胞内移行活性に優れた多数の候補クローンを得ることに成功し、中でも mT5 は Tat よりも 2.5 倍以上の細胞内移行活性を有することが判明した。さらに、mT5 は検討を行ったいずれの細胞種に対しても全く細胞傷害活性を示さないことを明らかとした。以上の結果より、新たに創出した mT5 は、細胞内移行活性及び安全性を両立した薬物導入キャリアーであることが判明した。

有効かつ安全な細胞内薬物療法を確立するためには、薬物を細胞内に高効率に送達した上で、さらにその薬物を標的オルガネラへと送達可能な薬物動態制御法が必要となる。しかし、細胞内に移行した PTD の大部分がエンドソーム内に捕捉されることから、薬物のオルガネラ移行が阻害され、導入した薬物の薬効が著しく限局されてしまうことが予想される。そこで、インフルエンザ由来のエンドソーム膜破壊ペプチド (HA2) 及びオルガネラ移行シグナルペプチドを活用することで上記問題点を克服した細胞内 DDS の確立を試みた。蛍光蛋白質 (VENUS) に Tat を融合させただけでは、VENUS はエンドソーム内に捕捉されたままの状態であるのに対し、Tat を付与した HA2-Tat を併用することによって、VENUS を細胞質へと送達できることを明らかとした。また、代表的なオルガネラ移行シグナルである SV40 由来の核移行シグナル (NLS) を利用することによって、VENUS を核内へと選択的に送達できることを明らかとした。さらに、3 種類の機能性ペプチド (PTD、HA2、NLS) を活用した核ターゲティング技術によって、核内に局在する蛋白質を標的としたペプチド性医薬品の薬効を増強できることを明らかとした。本研究で確立した細胞内ターゲティング技術は、様々なオルガネラ移行シグナルを利用することによって、核以外のオルガネラへも選択的に高分子を送達することが可能な方法論であることから、将来的には薬物の細胞内挙動を自在に制御可能な基盤技術になるものと考えられる。

以上、本研究では、独自の PTD 改良法や細胞内ターゲティング技術の開発を試み、PTD の問題点を克服した新しい細胞内薬物動態制御法の開発に成功した。本研究で確立した細胞内薬物動態制御技術が、ポストゲノム時代の創薬基盤技術としてプロテオーム情報を最大限に活用した治療戦略の開発に大きく貢献できるものと期待している。

論文審査の結果の要旨

蛋白質は、その局在や相互作用を通じて複雑なネットワークを形成し、細胞や組織、個体の恒常性を維持している。疾患を生命体の恒常性が破綻した状態であると捉えるならば、恒常性維持の最上流で機能する細胞内蛋白質を標的とした治療戦略は、疾患の根本的な治療方法になり得る可能性を秘めている。この治療法を確立するためには、薬物を細胞内に効率よく送達した上で細胞内での薬物動態をも緻密に制御可能な Drug Delivery System (DDS) の開発が必須である。本研究では細胞内移行活性を有する Protein Transduction Domain (PTD) を応用した細胞内 DDS 技術の開発を試み、以下の結論を得た。

1. 既存の主たる PTD (Tat, Antp, Rev, VP22) のキャリアー特性を比較検討することによって、PTD を用いた細胞内薬物動態制御法の確立には、①細胞内移行活性と安全性の両立、②エンドソーム脱出能の付与、が必須であることを明らかとした。
2. ファージ表面提示法と PSIF を利用した独自の細胞内移行活性評価法を組み合わせることにより、ファージ表面提示 PTD ライブラリの中から、望みの機能を付与した改良型 PTD を自在に単離可能な 2-step スクリーニング法の開発に成功した。
3. 2-step スクリーニング法を駆使することによって、安全性を保持しつつ、細胞内移行活性のみを選択的に向上さ

せた改良型 PTD (mT5) の創製に成功した。

4. PTD、エンドソーム破壊ペプチド、オルガネラ移行シグナルを組み合わせた独自の細胞内ターゲティング技術を考案し、本手法を適用することによって分子量数万の蛋白質をも核内へと積極的に送達可能であることを実証した。
5. 4. で確立した細胞内ターゲティング技術の適用により、細胞質や核に局在する蛋白質を標的としたペプチド性抗がん剤の薬効を飛躍的に増強可能であることを明らかとした。

以上、本研究では、細胞内薬物動態制御法の最適化に適う PTD 改良指針の明確化を試み、細胞内移行活性と安全性の両立、エンドソーム捕捉性の克服が必要不可欠であることを見出した。さらに、独自の PTD 改良法や細胞内ターゲティング技術の確立により、新しい細胞内薬物動態制御法の開発に成功した。本研究で確立した細胞内薬物動態制御技術は、蛋白質のみならず、低分子化合物や遺伝子、さらには機能性ナノマテリアルといった粒子状物質にまで適用可能な極めて汎用性の高い方法論であり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものとする。