

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第6分野

医用材料及び製剤設計技術の開発に関する研究

特定組織標的指向能を有するインテリジェント修飾高分子の新規デザインおよび生理活性タンパク質のバイオコンジュゲート化DDSへの応用

所属 大阪大学薬学研究科薬剤学分野
研究者 堤 康央

要旨

DIVEMA による腫瘍壊死因子 (TNF- α) のバイオコンジュゲーションを通じて、比活性低下を防ぐ新規バイオコンジュゲーション法の確立と共に、特定組織 (腎臓) への標的指向性と免疫賦活化能を有した新規薬物徐放型修飾高分子 (PVP-MA) を得た。

1. 研究目的

本研究は、3ヶ年で特定組織への標的指向能や免疫賦活化能を有する薬物徐放型修飾高分子を設計し、ポストゲノム戦略に叶う「生理活性タンパク質のバイオコンジュゲート化 DDS システム」を創出しようとするものである。初年度は以下の観点から、特定組織 (腎臓) への標的指向性と免疫賦活化能 (IFN- γ 誘導能) を有した薬物徐放型修飾高分子 (PVP-MA) の新規設計を目指した。ポストゲノム新時代を迎え、再生医療といった新たな疾病治療法の台頭と共に、創薬概念も急激に変化しており、今後続々と同定されるであろう生理活性タンパク質やサイトカインを有効な医薬品として適用しようとする試みが、さらに期待されている。しかし通常、生理活性タンパク質は生体内安定性に乏しいため、医薬品として適用する際には、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っている。また一般にサイトカイン等は、多様な *in vivo* 生理活性を示すため、選択的に副作用のみを軽減することは困難であり、この点においても臨床応用が極度に制限されている。従って、生理活性蛋白質を医薬品として創出していくためには、生体内安定性を向上させ、かつその複雑な *in vivo* 生理作用の中から目的とする治療作用のみを選択分離し得る創薬技術の開拓が必須となってくる。以上の観点から我々はこれまで、水溶性高分子による生理活性タンパク質のバイオコンジュゲーション (Bioconjugation) を試み、上述の両課題を解決し得るシステムの構築を図ってきた。本研究はこれまでの知見をもとに、さらに優れた、実用可能な生理活性タンパク質製剤の創出を最終目的に、修飾高分子としての有用性を我々が明らかとしたポリビニルピロリドン (PVP) 等を幹高分子として適用し、薬物徐放化能を有する PVP 誘導体等に特定疾病組織標的指向能や免疫細胞指向能、免疫賦活化能をも導入した新規機能性修飾高分子をデザインすることで、薬物の生体内挙動が時間的・空間的に制御された次世代型バイオコンジュゲート化医薬品を分子設計しようとするものである。

2. 研究背景

サイトカイン等の生理活性タンパク質は、細胞と細胞のコミュニケーションを司る分子であり、多細胞生物の生命維持、即ち発生・分化及び造血・免疫・神経系等の成立とその働きに不可欠の役割を担っている。そのため、これら生理活性タンパク質の過不足が、様々な病態形成・憎悪と密接に関連していることが明らかとなってきた。一方で分子細胞生物学・遺伝子工学の発達により、種々生理活性タンパク質が大量生産可能になり、これらを各種疾病治療に応用しようとする試みが注目されている。この流れは、ポストゲノム新時代を迎え、今後数多くの生理活性タンパク質が同定されていくことも相俟って益々期待されるであろう。しかしサイトカイン等の生理活性タンパク質の多くは、生体内にそのまま投与しても、各種プロテアーゼによって分解されてしまううえ、速やかに腎排泄されてしまうため、体内安定性に極めて乏しく、標的組織のみに有効量だけを送達することは難しい。従って、十分な治療効果を得るためには、大量頻回投与を余儀なくされ、その結果ホメオスタシスが崩壊し、重篤な副作用を招いてしまっている。そのためサイトカイン療法は、期待されつつもその臨床応用を断念視されているのが現状である。本来サイトカインは、生体内の局所で paracrine あるいは autocrine 的に作用して細胞を活性化し、3 次元的に様々なサイトカインの産出を誘導したり、細胞表面受容体の発現を調節したりするとともに、サイトカイン間で相乗的あるいは相加的に、時には互いに拮抗的に作用を及ぼし合い、複雑なサイトカインネットワークを作り上げ、生体のホメオスタシスを維持している。即ち、サイトカインは一つ一つが個別に存在しているのではなく、一つのサイトカインの産出が他のサイトカインの産出、あるいは応答に影響を及ぼすという複雑なネットワークの中でその作用が制御されている。そのため、生体外から大量のサイトカインを投与すると、上述したような巧妙かつ複雑なネットワークを破壊させてしまい、思わぬ副作用が現れてしまう。従って、サイトカイン療法を実現させていくには、サイトカインを作用発現部位に望ましい濃度-時間パターンのもとに選択的に送り込むことで、複雑なサイトカインネットワークを保ったうえで、作用を発現させ得る、適切な Drug Delivery System (DDS) が必要となってくる。さらに、サイトカインは多彩な生理作用を有するため、目的とする治療作用とその他の副作用の原因となる作用とを分離し、治療作用のみを選択的に引き出し得る最適の DDS が確立さ

れてはじめて、サイトカインを有効な医薬品として臨床応用できるものと考えられる。例えば、腫瘍壊死因子 (TNF- α) は当初、腫瘍部位に出血性壊死を誘導する因子として報告され、腫瘍を特異的に傷害するサイトカインとしてその臨床応用が期待された。しかし、他のサイトカインと同様に体内安定性に乏しいために、極度の大量頻回投与を余儀なくされてしまい、重篤な副作用を招いてしまう結果となっている。TNF- α は当初考えられていたよりもはるかに広範な作用を有し、炎症を通じた生体防御機構に関わる、複雑なサイトカインネットワークの一翼を担っている事が明らかになってきた。それ故、生体外から大量の TNF- α を投与すれば、ホメオスタシスが崩壊し、重篤な副作用が引き起こされるのも当然であろう。この副作用のため、全身投与では投与量が極度に制限され、その結果奏効率は 5 % 前後と、期待を裏切る結果に終わっている。しかしその一方で、局所投与によっては高い奏効率が得られていることから、適切な DDS を確立する事により癌治療への応用が可能になると考えられる。

近年、生理活性タンパク質を、様々な水溶性高分子で修飾する、Bioconjugation が考案されてきた。これは、みかけの分子量増大によって腎糸球体濾過を抑制するとともに、修飾高分子が形成する立体障害によって蛋白分解酵素からの攻撃を回避することによって、体内安定性を改善しようとするアプローチである。これまで、アデノシンデアミナーゼ (ADA) やアスパラギナーゼ等の Bioconjugation が試みられており、中でも ADA を Polyethylene glycol (PEG) で修飾した PEG-ADA は、アメリカの食品医薬品局 (FDA) から医薬品として承認され、ADA 欠損症の治療薬として著明な臨床成果をあげている。しかし、これら一部の酵素タンパク質では良好な結果が得られているものの、Bioconjugation により体内安定性が改善される一方で、組織移行性の低下、作用発現に関与する官能基の修飾による活性低下や、さらに、サイトカインのように活性発現にレセプターとの結合を要する場合には、修飾高分子の立体障害によるレセプター結合阻害も引き起こされるため、酵素タンパク質のみならず、サイトカイン等に広く応用するためには、修飾率や修飾部位の制御手段の開発等、基礎的な Bioconjugation の方法論を確立することが必要となってくる。さらに、Bioconjugation によって、単に体内安定性を改善するだけで、副作用を含めた全ての作用が増強されたのでは意味がなく、治療作用のみを選択的に引き出していく必要もある。この点我々はこれまで、バイオコンジュゲート医薬品が、結合した修飾高分子の特性を帯びることを見出し、これは言い換えれば、用いる修飾高分子を選択することによって体内動態を緻密に制御できること、さらに、本来薬物が有していない作用等も付与でき得ることを意味している。従って、例えば、ターゲティング能を有する修飾高分子を用いることで体内動態を緻密に制御し、標的部位へ選択的に送達できれば、サイトカインネットワークを破壊させることなく作用を引き出し得るであろうし、また、サイトカイン間の相互作用等を利用し、その作用を増強し得る薬理活性を有する修飾高分子を用いることで、目的とする治療作用を選択的に引き出し得るとも考えられる。つまり、Bioconjugation によって、サイトカイン療法最適化を成し遂げるには、目的に応じて修飾高分子を選択し、適切な機能を付与する事で、バイオコンジュゲート医薬品をインテリジェント化していく事が必須となってくる。そのためには、Bioconjugation の目的やサイトカインの性質に応じた機能性高分子を設計し、それを Bioconjugation に応用していかなければならない。

合成修飾高分子の中で、正又は負の電荷を有するものは、生体と様々な相互作用を示す事が示されてきた。正の電荷を有する高分子 (ポリカチオン) は、抗菌作用を持つことが知られているが、生体内では強い毒性を示すため用途が限られている。一方、負の電荷を有する高分子 (ポリアニオン) は生体内での毒性も少ないため、医薬品として適用が期待されている。例えば血液凝固剤として用いられている天然ポリアニオンであるヘパリンは細胞分裂阻害作用を有することから、ヘパリンと同様の硫酸基をもつポリエチレンスルホン酸ナトリウムの制癌作用が検討され、これがマウスの白血病に有効なことを見出されている。それ以来、ポリアクリル酸、ポリスチレンスルホン酸ジビニルエーテル無水マレイン酸共重合体 (DIVEMA) 等、数多くのポリアニオンが制癌活性を持つことが明らかにされた。この中でも DIVEMA は、1 分子のジビニルエーテルと 2 分子の無水マレイン酸が共重合したものであり、共重合する過程で原料物質中には存在しない含酸素 6 員環 (ピラン環) が生じることからピラン共重合体とも呼ばれている。DIVEMA は単独で、抗菌活性、抗ウィルス活性、インターフェロン (IFN) 誘発活性等様々な生物活性を示し、さらに免疫系を活性化することも知られており、高分子制癌剤として臨床試験も行われた。しかし、当初用いられていた DIVEMA は分子量分布が極めて広く、分子量 10 万以上の高分子量分画が副作用の原因になることが明らかになり、その後 DIVEMA の分子量と抗癌活性の関係について、詳細に検討が行われた。その結果、現在では毒性が低く抗癌活性を維持するには分子量 1 万から 3 万のものが適当であるとされている。しかし、DIVEMA に限らず OK-432 といった BRM (Biological Response Modifier) 等、免疫を活性化することで抗腫瘍効果を示す免疫活性化物質は、固形癌を治療できるほど作用は強くなく、実際に DIVEMA 単独では、一部の腹水癌においてしか効果が認められない。そのため、DIVEMA の免疫賦活化能、抗癌活性の相乗効果を期待して、癌治療における高分子キャリアとして、今後如何に DDS へ利用していくかが注目されている。

この点我々は PEG や Polyvinylpyrrolidone (PVP) 等の水溶性高分子を用い、TNF- α をはじめとする種々のサイトカインの Bioconjugation を試みてきた。その結果、バイオコンジュゲート体の分子量-修飾率-比活性の相関や血中滞留性-標的組織移行性等のバランスを考慮し、最適条件を見出していくことで、目的とする治療効果のみを効果的に増強でき得ることが判明している。しかし、より安全性、有効性に優れ、臨床応用を期待させるタンパク質療法 (サイトカイン療法等) を創出するには、治療の目的や個々のサイトカインの性質に応じて、様々な機能を付与し、インテリジェント化を図っていく必要がある。そのためには、上述したような免疫賦活化能や薬物徐放化能、標的指向能を有する機能性高分子の開発が必須となってくる。以上の観点から本年度は、Bioconjugation によるサイトカインへの機能付与を目的とし、共同研究者により

デザインされた機能性高分子 (DIVEMA) による Bioconjugation を試み、基礎的情報の収集を図ると共に、得られた知見をもとに、薬物徐放性と免疫賦活化能、さらには特定組織標的指向性を併せ持った新たな新規修飾高分子 (PVP 誘導体: PVP-MA) の創出を図った。即ち TNF- α の抗腫瘍効果は IFN- γ 等のサイトカインにより相乗的に高め得ることから、薬物徐放化能を有し、かつ免疫賦活化能 (IFN 誘導能) を有する DIVEMA に着目し、TNF- α の Bioconjugation に適用した。その際、活性低下を防ぐなど、比活性保持の点で新たな Bioconjugation 法の確立も試みた。また、作製したバイオコンジュゲート TNF- α の薬物治療への応用について検討を加えた。さらにこれらの基礎的情報をもとに、日本薬局方収載品として安全性が高く、またラジカル共重合により容易に種々の官能基を導入できる幹ポリマーとして、その有用性を提示してきた PVP への薬物徐放能・免疫賦活化能・標的組織指向能といった機能導入とその特性評価を試みた。

3. 研究方法

ヒト天然型 TNF- α (2.23×10^6 JRU/mg in PBS) へ 0.1 N NaOH を加えて pH 8.5 とし、DMSO に溶解した DMMAAn 40 μ g を添加し、30 分間反応させた。次に pH 8.5 を維持したまま、DMSO に溶解した DIVEMA 0.1 mg を 5 回に分けて添加した。その後 0.1 N HCl で pH 6.0 に調製し、37 $^{\circ}$ C で DMMAAn を解離させた。DMMAAn の結合、解離、また DIVEMA の結合はフルオレスカミン法により測定した。反応終了後、ゲル濾過 HPLC により 2 つの分子サイズに分取した。バイオコンジュゲート TNF- α の比活性測定は、LM 細胞を用いた細胞傷害性試験により評価した。DIVEMA-TNF- α の in vivo 抗腫瘍効果は、Sarcoma-180 (S-180)・Meth-A 繊維芽肉腫を皮内移植したマウスを用いて、各サンプルを尾静脈投与した後、腫瘍増殖・出血壊死を指標に評価した。DIVEMA-TNF- α の静脈内投与後の体内動態は、 125 I ラベル化体を用い検討した。In vivo における DIVEMA の IFN- γ 誘導能は ELISA により測定した。各種アニオン性導入 PVP は、主モノマーとしてビニルピロリドン (VP) 5 g を使用し、VP に対して 5 分の 1 モルの種々アニオン性官能基を有したビニル化合物をコモノマーとして混合し、ラジカル共重合法により作製した。コモノマーとしては、アクリル酸、ビニルスルホン酸ナトリウム、無水マレイン酸を用いた。アクリル酸導入 PVP、ビニルスルホン酸導入 PVP、無水マレイン酸導入 PVP (PVP-MA) は、ラジカル重合の開始剤として、4, 4'-アゾビス (4-シアノ吉草酸) 151 mg (0.54 mmol)、連鎖移動剤として β -メルカプトプロピオン酸 234 mg (2.2 mmol) を使用した。得られたコポリマーは全て、ゲル濾過 HPLC により、平均分子量 5,000~6,000 に分取・精製した。なお平均分子量は、高分子分子量マーカー (PEG) を用いて算出した。

4. 研究成果・考察

これまでの我々の検討から、TNF- α のように活性発現にレセプターとの結合を要するサイトカインの Bioconjugation の場合、結合部位に存在するリジンアミノ基を修飾してしまう事による活性低下だけでなく、タンパク質に結合した修飾高分子が形成する立体障害によっても活性低下を招いてしまう事が判明している。従って、Bioconjugation により、目的とする治療作用のみを効率よく増強させるためには、闇雲に Bioconjugation を行えばよいのではなく、最適なバイオコンジュゲート体の分子量・修飾率・活性の相関を見出していく必要がある。この事を念頭に置いた上で、DIVEMA による TNF- α の Bioconjugation を考えた場合、DIVEMA はこれまで Bioconjugation に用いてきた PEG 等の主鎖片末端のみを結合部位とする Endpoint attachment 型の修飾高分子とは異なり、一分子内にタンパク質との結合部位を多数有する Multi-sidepoint attachment 型の修飾高分子である点が問題となってくる。即ち、一分子内に TNF- α との結合部位を多数有するため、単にそのまま反応させてしまうと、一分子の DIVEMA が多数の部位で TNF- α のリジン残基と結合し (分子内架橋)、修飾率が高くなり、さらに、DIVEMA を介して TNF- α 同士が架橋してしまう (分子間架橋) と予想される。このような架橋が生じると、TNF- α 分子自身が DIVEMA 分子群の中に埋もれてしまったり、立体構造変化が生じてしまう為に、著しく活性を損なうものと予想され、その結果として前述の最適なバランスが得られない可能性が考えられる。そこで修飾率を制御し、分子内・分子間架橋を防ぐ目的で、pH に依存して可逆的にアミノ基と結合、解離する事が知られているジメチル無水マレイン酸 (DMMAAn) を TNF- α の Bioconjugation に応用することで、活性保持の点で優れた新規 Bioconjugation 法の確立を試みた。まずはじめに DMMAAn の pH 応答性を、リジンアミノ基のモデルとして ϵ -アミノカプロン酸を用い、フルオレスカミン法により遊離のリジンアミノ基量を経時的に定量することで評価した。その結果、pH 6.0 以下では速やかに、DMMAAn がアミノ基から解離することが判明した。また、TNF- α は pH 6.0 で活性を損なわないことが確認できたので、DMMAAn の解離条件は、pH 6.0 と設定した。また、pH 7.0 でも、長時間を要してではあるが解離することが判明した事から、特に pH 変化に弱く、pH 6.0 では活性を損なってしまうようなタンパク質の場合でも、pH 7.0 で時間をかけて解離させることで、DMMAAn が応用できる可能性が示唆された。次に、モデルタンパク質としてキモトリプシノーゲン A を用い、DMMAAn を利用した DIVEMA による Bioconjugation を行った。即ちキモトリプシノーゲン A のリジンアミノ基を DMMAAn で保護した後に DIVEMA を反応させ、その後 DMMAAn を解離させるという方法で Bioconjugation を行うことで、架橋の抑制を試みた。DMMAAn の添加量を、キモトリプシノーゲン A のリジンアミノ基に対して 3 倍モル量、1 倍モル量、0.3 倍モル量と変化させることによって、キモトリプシノーゲン A のリジンアミノ基のそれぞれ、約 70%、約 40%、約 20% が保護された。さらに DIVEMA を添加すると全ての群において、反応したリジンアミノ基は約 85% 程度になった。その後、2 時間放置することによって、DIVEMA の無水マレイン酸部分を全て開環させ、反応性が無くなっていることを確認した後に、pH を 6.0 に調製して、DMMAAn を解離させた。pH を変化させた 30 分後では、 ϵ -アミノカプロン酸の場合とは異なり、完全には

DMMAAn の解離が終了していなかった。そこでさらに 37 °C に保ち続けると 90 分後には完全に DMMAAn が解離した。一方で DMMAAn(-) 群ではアミノ基量の変化が見られなかった事から DIVEMA 自身の結合は pH 6.0 の条件下では安定であることが示された。DMMAAn の解離が ϵ -アミノカプロン酸の場合に比べて遅れた理由は不明であるが、モデルとして用いた ϵ -アミノカプロン酸は低分子であるが、タンパク質のように高分子になると解離が遅くなる、また、DIVEMA が結合していることによる立体障害等によって解離が遅くなる等の可能性が考えられた。さらに、ゲル濾過 HPLC によって、各バイオコンジュゲート体の溶出パターンを比較してみると、DMMAAn 未処理のサンプルでは、native 体のピークは全く観察されず、排除限界部分にのみピークが観察された。この部分の分子サイズを Protein standard から算出すると、約 700 KDa であり、キモトリプシノーゲン A のリジンアミノ基が全て DIVEMA によって修飾された場合の分子サイズ (約 450 KDa) よりも大きいため、DIVEMA を介したキモトリプシノーゲン A 同士の架橋が起こっているものと考えられた。一方 DMMAAn で保護しておく、保護する割合が高くなるにしたがって架橋物の割合が減少する事から、予想通り DMMAAn でキモトリプシノーゲン A のリジンアミノ基を保護しておくことで分子間架橋が防げることが判明した。また分子間架橋物が減少すると同時に、目的とする、DIVEMA が数分子結合したと考えられる分子サイズのバイオコンジュゲート体の割合が上昇してくることも判明した。しかし DMMAAn で 70 % 保護したサンプルでは、殆どが native 体として溶出され、DIVEMA が殆ど結合しなかったことが判明した。以上の結果から、目的とするバイオコンジュゲート体の収率等も考え合わせると、DMMAAn による保護率は 40~50 % 程度が適切であるものと考えられた。

Table I Characterization of DIVEMA-TNF-alpha

	Molecular a) size (kD)	Specific activity b) ($\times 10^4$ JRU/mg TNF)	Remaining activity (%)
Native TNF-alpha	32 ≥ 9263 ≥ 92 63	223.234.251.0 37.5 213.2	100.0
DIVEMA-TNF-alpha DMMAAn (-)			
Fr. 1			15.3
Fr. 2			22.8
DIVEMA-TNF-alpha DMMAAn (+)			
Fr. 1			16.8
Fr. 2			95.5

a) Determined by GFC (protein standard).

b) Assessed by growth inhibition of LM tumor cell assay.

次にこの DMMAAn を利用し、DIVEMA による TNF- α の Bioconjugation を試みた。さらに、作製したバイオコンジュゲート体の in vitro での活性を比較し、DMMAAn を用いた新しいサイトカインの Bioconjugation 法の有用性を検討した。TNF- α の遊離リジンアミノ基量を、経時的にフルオレスカミン法により定量したところ、DMMAAn を TNF- α のリジンアミノ基に対して 10 倍モル量添加することで、TNF- α のリジンアミノ基の 50 % が保護できた事が確認された。さらに DIVEMA を反応させることにより、約 20 % リジンアミノ基が修飾され、その後 pH を 6.0 に下げることににより速やかに DMMAAn が解離していることが確認できた。一方、DMMAAn を添加しなかった場合には DIVEMA により約 40 % のリジンアミノ基が修飾され、これは pH を下げることによっても変化しなかった。なお、DMMAAn 処理を行って作製したバイオコンジュゲート体を DIVEMA-TNF- α (+)、DMMAAn 処理を行わずに作製したものを DIVEMA-TNF- α (-) と示した。反応終了後、各サンプルをゲル濾過 HPLC により、その溶出パターンを解析すると、570kDa (TNF- α のリジンアミノ基が全て DIVEMA によって修飾された分子サイズ) 以上のピークが観察され、TNF- α 同士の架橋物が生じているものと考えられた。そこで、そのような架橋物が含まれず、TNF- α に DIVEMA が 1 分子結合したと考えられる低分子分画を Fraction 2 (Fr. 2)、それよりも高分子分画を Fraction 1 (Fr. 1) として分取を行った。得られた DIVEMA-TNF- α の in vitro 比活性を評価したところ (DIVEMA は in vitro において 1 mg/ml でも細胞毒性は認められておらず、LM 細胞においても、DIVEMA 単独では、250 μ g/ml (反応に用いている DIVEMA 量は 100 μ g) でも全く傷害性を示さないことから、TNF- α の比活性測定に影響しないことを確認している。)、Fr. 1 では、DMMAAn 処理、未処理群とも著しい活性低下が観察され、TNF- α 同士の分子間架橋により著しく活性を損なってしまうことが示唆された (Table I)。一方、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、ほとんど活性低下が観察されず、DIVEMA-TNF- α (-) Fr. 2 と比較しても高い活性を保持していた。これは、DMMAAn を用いることにより、分子内架橋等を防ぐことにより、修飾率を低く抑えられたためではないかと考えられた。さらに、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、高分子で修飾したにも関わらず、native 体と比較してほとんど活性低下が見られなかった事から、DMMAAn が活性発現に重要なリジン残基を保護した可能性も考えられた。さらに、DMMAAn による TNF- α のリジンアミノ基の保護率を変えて、その比活性を比較した。その結果、保護率の減少に伴って、残存活性も低下することが判明し、約 50 % のリジンアミノ基を保護することではじめて、活性を損なうことなくバイオコンジュゲート体を作製できることが分かった。さらに同じ分子サイズであるにも関わらず、このように

DMMAAn による保護率によって残存活性が減少したことから、DMMAAn で TNF- α のリジン残基を保護しておくことによって、分子内架橋を防げた可能性が示唆された。

次に作製した各種 DIVEMA-TNF- α について、in vivo における抗腫瘍効果を比較検討した。各種 DIVEMA-TNF- α の in vivo 抗腫瘍効果をスクリーニングするため、S-180 担癌マウスに単回尾静脈内投与を行った。投与 24 時間後、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 1, Fr. 2 では、顕著な出血壊死作用が観察され、native TNF- α と比較して 5 倍以上もの抗腫瘍効果が得られた。一方、DIVEMA-TNF- α (-) では、ほとんど出血壊死作用は認められず、DIVEMA のような Multi-sidepoint attachment 型の修飾高分子の場合、単に Bioconjugation するのではなく、DMMAAn を用いて修飾率を制御することにより、はじめて in vivo 抗腫瘍効果増強が可能になると考えられた。さらに延命効果においては、native TNF- α 投与群では 5 例中 3 例が突然死する 10,000 JRU の投与においても、完全治癒が得られなかったのに対し、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群では、1,000 JRU の投与において、突然死を伴うことなく、5 例中 1 例の完全治癒が得られた。一方、出血壊死作用では DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 と同程度の作用が得られていた DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 1 でも、完全治癒例は得られず、特に DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の高い有用性が示唆される結果となった。

本研究で Bioconjugation に用いた分子量 3 万の DIVEMA は、1 分子内にタンパク質との結合部位である無水マレイン酸構造を約 220 個も有しているため、単に Bioconjugation を行うのでは、分子内、分子間架橋等複雑な結合が生じてしまい、修飾率の制御が困難であると予想された。DMMAAn は pH 依存的にアミノ基と結合、解離するアミノ基保護試薬として知られているが、我々との共同研究者である Hirano らにより、SOD の Bioconjugation に応用された例が唯一報告されているにすぎない。そこでこの DMMAAn のアミノ基保護能力及び解離に関して詳細に検討するとともに、この DMMAAn をサイトカインの Bioconjugation に応用したところ、DMMAAn で TNF- α のリジンアミノ基を約 50 % 保護しておく事で、分子内・分子間架橋を防ぐとともに、修飾率を低く抑え、in vitro での比活性を殆ど損なうことなく Bioconjugation を行えた。一般に Bioconjugation では、修飾高分子の形成する立体障害によりプロテアーゼからの分解を防ぎ、また、分子量増大により腎糸球体濾過を回避することによって体内安定性を向上させ得る反面、立体障害、さらに活性発現に関与する官能基の修飾等によって活性低下を引き起こしてしまう。そのため、Bioconjugation 設計において必ず問題となる比活性低下を、修飾率、修飾部位を制御することで改善できる、新しい Bioconjugation 方法の開発が待望されてきた。DMMAAn はランダムに TNF- α のリジンアミノ基と反応するため、その結合部位を厳密に制御する事は出来ない。しかし、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 が、in vitro での活性をほとんど完全に保持していたこと、さらに詳細は後述するが、これまで我々が Bioconjugation に用いてきた Endpoint attachment 型の PEG 等の場合でも高活性なバイオコンジュゲート体を作製できたことから、条件検討を行い最適条件を見出すことで、DMMAAn が TNF- α の活性発現に重要なリジンアミノ基をうまく保護した可能性が示唆された。この活性保護機構に関しては、TNF- α の活性発現に特に重要とされている Lys11 が立体的に外側を向いている事から、DMMAAn がこの Lys11 と反応しやすかった可能性も考えられるが、その詳細は、今後更なる検討が必要であると考えられる。さらに、in vivo における抗腫瘍効果においても、DMMAAn を用いて作製した DIVEMA-TNF- α (+) のみで効果増強が観察された。これまでの一連の研究から、PEG や PVP を用いた Bioconjugation において、in vivo 抗腫瘍効果を増強するためにはバイオコンジュゲート体の分子サイズや比活性等のバランスをうまく保つ必要がある事が判明している。従って今回の結果は、DIVEMA のような Multi-sidepoint attachment 型の修飾高分子の場合、単に Bioconjugation を行っただけでは、修飾率を制御することができず、残存活性が著しく損なわれてしまうが、DMMAAn を用いて修飾率を制御する事で、残存活性や分子サイズ等のバランスのとれたバイオコンジュゲート体を作製でき、その結果、in vivo での抗腫瘍効果増強が可能になった事を示している。以上の検討から、DMMAAn を用いた新しいサイトカインの Bioconjugation 法が確立され、その有用性が示唆された。今後より詳細に活性保護機構等を検討していくことで、この DMMAAn による新しいサイトカインの Bioconjugation 法は、より高活性なバイオコンジュゲート体の分子設計を考える上で、有効な手段になるものと期待される。

我々はこれまで、サイトカインの体内安定性の改善のみならず、作用の選択性を付与しうる創薬法として Bioconjugation に着目してきた。その中で、血中滞留性や標的組織移行性等のバランスを考慮し、最適条件を見出していくことで、主作用と副作用とを分離し得ること、その結果目的とする治療作用を効果的に引き出し得る事を示唆してきた。そこで、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の治療効果（抗腫瘍効果）を追求するとともに、副作用を詳細に検討する事で、バイオコンジュゲート体の薬物治療への応用の可能性を探るとともに、適切な Bioconjugation によって、サイトカインへ作用の選択性付与が可能であるかを評価した。TNF- α 高感受性とされる Meth-A 繊維芽肉腫に対する DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果を検討することで、その抗癌剤としての有用性を、週 2 回計 4 回の頻回投与により評価した（Table II）。DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群では、50 JRU 以上の投与において、native TNF- α 10,000 JRU 投与に匹敵する顕著な出血壊死作用が観察され、この作用はほぼプラトーと考えられた。さらに、native TNF- α 投与群では、5,000 JRU 及び 10,000 JRU の投与において、投与期間中にのみ、ようやく腫瘍増殖抑制が観察されたにすぎず、投与終了後に再び腫瘍増殖が認められ、それぞれ 27 例中 6 例、33 例中 8 例の完全治癒が得られたにすぎなかった。さらに、突然死するマウスも見られ、特に 10,000 JRU の投与では、約半数が突然死する等、native TNF- α 投与群では、完全治癒は得られるものの、重篤な副作用が認められた。一方、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群では、50~500 JRU 投与において、顕著に腫瘍増殖が抑制され、100 JRU 以上の投与ではほぼ完全に腫瘍増殖が抑制された。さらに、わずか 50 JRU の投与でも 22 例中 17 例の完全治癒が得られる等、すべての投与量において高い完全治癒率が得られた一方で、native 体で認められたような突然死は全

く観察されなかった。これらの結果は、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗癌剤としての高い有用性を示唆するものである。さらに、完全治癒したマウスに対して、腫瘍の Rechallenge を行ったところ、Meth-A は完全に拒絶された。一方で、Colon-26 は生着したことから、Meth-A に対する腫瘍免疫が誘導されているものと考えられた。また今回は、DIVEMA 単独投与群では全く抗腫瘍効果が得られなかったが、これは、投与量が 3 μ g (DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 中の DIVEMA 量) と少なかったこと、さらに、DIVEMA の抗腫瘍効果が報告されているのは、主に腹腔内投与であるのに対し、今回は静脈内投与を行っているためであると考えられた。また、DIVEMA と TNF- α の mixture でも全く抗腫瘍効果は得られなかったことより、単に DIVEMA と TNF- α を併用したために抗腫瘍効果が増強されたのではなく、適切な Bioconjugation を施すことにより、はじめて抗腫瘍効果を増強でき得るものと考えられた。TNF- α の臨床上の副作用としては、発熱、血圧低下、血小板減少、消化管障害、肝機能障害等が報告されている。発熱や血圧低下に関しては、インドメタシンやケトプロフェン等プロスタグランジン産出阻害剤により、ある程度克服できるようになってきたものの、他の副作用のために、臨床応用は進展していない。そこで次に、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の副作用について詳細に検討した。まず全身的な副作用の指標として体重変化を観察した。native TNF- α 投与群では、腫瘍増殖抑制が認められた 5,000 JRU 以上の投与では、体重増加の抑制傾向が認められ、特に 10,000 JRU 投与群においては、投与期間中に顕著な体重減少が観察された。これに対し、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群では、そのような体重減少は認められず、Intact マウスと同様の体重増加を示した。次に、白血球及び血小板数への影響を腫瘍を移植していない Intact マウスに対する比率により評価した。DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群においては、投与直後に一過性の血小板減少が認められたが、その後速やかにコントロールレベルに回復した。TNF- α の出血壊死作用は、腫瘍の微小血管で血栓形成が促進される事により引き起こされるため、投与直後の一過性の血小板減少は、腫瘍の出血壊死に伴う血小板の消費によるものと考えられた。また、正常マウスに一過性の血小板減少を引き起こすと、血小板生成が促進され、数日後には血小板数が通常レベルよりも上昇した後に、通常レベルに戻り安定する。DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群でも同様の傾向が認められた事から、骨髄機能が正常であると考えられた。これに対し native TNF- α 10,000 JRU 投与群においては、投与直後の血小板減少はすぐには回復せず、長期にわたり血小板減少状態が続いた。これは、骨髄抑制に伴い血小板産出に異常をきたした為であるものと考えられた。さらに、白血球数に関しては、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群では、コントロール群と有意な差は見られなかったが、native 10,000 JRU 投与群において白血球数の減少傾向が認められ、これも前述の骨髄抑制に伴うものと考えられた。他の血球成分(赤血球、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値)に関しては、native 体投与群、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群ともコントロール群と比較して有意な差は見られなかった。さらに、GPT 活性を指標として肝障害について検討すると、native TNF- α 10,000 JRU 投与群において、投与 24 時間後に GPT 活性の上昇が観察され、肝障害が認められた。これに対し、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 投与群では、十分な抗腫瘍効果が得られた 50 JRU の投与や、その 10 倍量の 500 JRU の投与においても、肝障害は認められなかった。さらに BUN を指標に、腎障害について検討したところ、native TNF- α 10,000 JRU 投与群においてのみ、投与直後に BUN の顕著な上昇が認められた。以上、native 体では抗腫瘍効果が得られる投与量では副作用を避け得ないが、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、抗腫瘍効果が顕著に増強されている一方で、native 体で認められた重篤な副作用は認められない事から、その癌治療における高い有用性が示唆された。

Table II Survival time for mice bearing Meth-A solid tumors treated with native TNF-alpha or DIVEMA-TNF-alpha

	Single i.v. injection dose (JRU/mouse)	Survival time ^{a)} (Days)	Sudden death	Complete regression ^{b)}
PBS control		38 \pm 1	0 / 28	0 / 28 (0%)
DIVEMA (3 μ g)		37 \pm 2	0 / 21	0 / 21 (0%)
DIVEMA(3 μ g) + Native TNF	500	42 \pm 2	0 / 5	0 / 5 (0%)
Native TNF-alpha	10,000	>44 \pm 11	15 / 33	8 / 33 (24%)
	5,000	>62 \pm 12	2 / 27	6 / 27 (22%)
	2,000	>51 \pm 9	0 / 22	3 / 22 (13%)
DIVEMA-TNF-alpha	500	>128 \pm 10*	0 / 17	13 / 17 (76%)
DMMAN (+) Fr. 2	200	>132 \pm 10*	0 / 18	15 / 18 (83%)
	100	>122 \pm 13*	0 / 17	13 / 17 (76%)
	50	>125 \pm 10*	0 / 22	17 / 22 (77%)

a) Days after first treatment (Mean \pm SE).

b) Complete regression was defined when tumor was not regrown for more than 150 days.

Statistical significance compared with PBS control. *P < 0.001.

TNF- α を含め多くのサイトカインは、複数のレセプターを有するうえ、同一のレセプターを介してさえ異なるシグナル伝達機構により様々な作用を示す。そのため、その臨床応用を考えた場合、目的とする治

療作用（主作用）を他の副作用と分離して、選択的に引き出さなければならない。現在 TNF- α の場合、抗腫瘍効果を相乗的に高めようとした併用療法等のアプローチが試されている。特に IFN- γ は腫瘍細胞表面 TNF 受容体を誘導することが見出され、さらに *in vitro* 及び *in vivo* で相乗効果を示すことも確認されたことから、TNF- α との併用療法が期待された。しかし、これまでのところ TNF- α の全身投与と IFN- γ の併用による奏功率の向上は確認されていない。これは、両者とも体内安定性に乏しいサイトカイン同士であり、たとえ全身投与により併用したとしても、局所的に共存させることができず、期待するような相乗効果が得られないためであろう。つまり、相乗効果により TNF- α の抗腫瘍効果を高めるには、両者を何らかの方法で局所に効率よく共存させる必要がある。バイオコンジュゲート医薬品は結合した修飾高分子の特性を帯びることを我々は見出しており、これは言い換えれば、本来薬物が有していない作用等も付与でき得る可能性を示している。以上の観点から、DIVEMA の IFN- γ 誘導能、免疫賦活化能に着目し、この機能を Bioconjugation によって TNF- α に付与しようと試みた。今回作製した DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果は、native 体と比較して 100 倍以上にも増強されていた。一方で十分に抗腫瘍効果が得られる投与量でも、重篤な副作用は認められなかった。これらの結果は、DIVEMA を用い適切に TNF- α を Bioconjugation することで、目的とする抗腫瘍効果を、副作用と分離して増強し得ることを示している。今後は以上の知見をもとに、DIVEMA の機能を有した上、副作用発現組織には分布せず、腫瘍組織に効率よく送達できる等、さらに高度な機能を有する機能性修飾高分子の開発を行っていくことで、より治療作用と副作用を分離した有効なバイオコンジュゲート TNF- α を創製していかねばならない。また、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の有用性をさらに広げ、薬物治療へ応用していくためには、マウス腫瘍のみならず、ヌードマウスや SCID-hu マウスの系を用いてヒト腫瘍に対する治療効果等を追求していく必要もあると考えられる。

これまでに我々が検討してきた PEG 化 TNF- α の中で、最も治療効果が高かった MPEG-TNF- α はプロテアーゼ抵抗性、血中滞留性、腫瘍組織移行性等が最もバランス良く保たれており、その結果として目的とする治療効果が効率よく増強できた事が示唆されている。しかし、これらの最適条件を見出していくには、このような生体内諸因子とバイオコンジュゲート体との連関を詳細に検討し、Bioconjugation 設計における基礎的な情報を集積していく事も必要となってくる。その結果、最適の Bioconjugation 条件を予測できるようになり、それに基づいたバイオコンジュゲート医薬品の分子設計が可能になるものと考えられる。そこで次に、DIVEMA-TNF- α と、プロテアーゼ、TNF レセプター等の生体内因子との相互作用を検討し、Bioconjugation 設計における基礎的な情報の集積を図るとともに、副作用を回避し、抗腫瘍効果を効率よく増強し得る事が判明している DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果増大メカニズムの解明を試みた。さらに、これらの結果をもとに、癌治療を目的とした最適の修飾高分子の設計を念頭に、PVP への機能導入を試みた。まずはじめに DIVEMA-TNF- α のプロテアーゼ抵抗性を評価するとともに、DMMA を用いた新規 Bioconjugation 法の有用性を評価するため、PEG-TNF- α に DMMA を適用した場合のプロテアーゼ抵抗性と、DMMA を用いたなかった場合、即ち従来法で作製した PEG-TNF- α のプロテアーゼ抵抗性を比較した。プロテアーゼとしては、血清中等に内分泌されるプロテアーゼの大部分はセリンプロテアーゼであり、特にトリプシン型が多いとされていることから、今回はモデル蛋白分解酵素としてトリプシンを選択し、それに対する抵抗性を検討した。まず、DIVEMA-TNF- α (+) のトリプシンの分解に対する抵抗性を比較すると、分子サイズの大きい Fr. 1 の方が、若干ではあるがトリプシンからの分解抑制能が高かった。しかし、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 に関して見ると、1 時間では native TNF- α と比較して、分解抑制が認められるものの、3 時間以後では、native 体と同様に分解を受け、活性が損なわれていることが判明した。DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 は、予め DMMA により選択的に活性部位のリジン残基をうまく保護した状態で Bioconjugation することで作製していることから、逆に DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、活性部位が修飾高分子で覆われておらず、露出してしまっている事を意味している。そのために、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 ではほとんどプロテアーゼ抵抗性が認められなかった可能性が予想される。そこで、DMMA を用いた Bioconjugation 法と従来までの方法で作製したバイオコンジュゲート体のプロテアーゼ抵抗性を PEG-TNF- α を用いて比較した。DMMA を用いて作製したものを PEG-TNF- α (+)、用いなかったものを PEG-TNF- α (-) と表した。また、分取・精製したバイオコンジュゲート体は、高分子分画のものからそれぞれ HPEG-TNF- α 、MPEG-TNF- α 、LPEG-TNF- α とした。それぞれのバイオコンジュゲート体の比活性を測定したところ、どの分子サイズにおいても DMMA を用いたバイオコンジュゲート体の方が高比活性であった。PEG は DIVEMA と異なり、蛋白との結合部位を 1 つしか有しておらず、同じ分子サイズであれば PEG の修飾率は同一であると考えられる。それにも関わらず、DMMA を用いたバイオコンジュゲート体の方が、活性が高かった。これは、修飾部位が異なるためであると考えられ、DMMA で活性部位をうまく保護できた可能性を強く示唆する結末である。しかし、修飾率の低い LPEG-TNF- α (+) では、ほとんど活性低下は認められなかったものの、DMMA を用いても HPEG-TNF- α (+) など、修飾率が高くなるにつれ活性低下が認められている。これは、DMMA で保護した活性部位以外を PEG で修飾したとしても、修飾率が高くなると修飾高分子による立体障害が大きくなり、レセプターとの結合が阻害される事により、活性低下が引き起こされてしまう事も考えられた。次に、これらのプロテアーゼ抵抗性を比較すると、どの分子サイズにおいても DMMA(+) の方が、若干抵抗性に乏しかった。従って、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 で、ほとんどプロテアーゼ抵抗性が弱かったのは、DMMA で保護した事も一部は要因であるが、それだけでは説明できないものと考えられた。他の要因としては、DIVEMA は側鎖で蛋白と結合している為、末端で結合している PEG 等と水溶液中での立体構造が異なり、立体傷害の形成のされ方に相違がある可能性も考えられる。また、修飾高分子の分子量や修飾高分子自身の Flexibility 等も、その立体構造に大きく影響している可能性

も考えられるが、今後、これらの点に関して、詳細な検討が必要であると考えられた。

近年、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance : SPR) を利用したバイオセンサーである BIAcore が開発され、生体分子間の相互作用をラベルなしでリアルタイムに観察することが可能となった。この BIAcore は、相互作用する分子のうち一方をセンサー表面上に固定化し、他方を含む試料をマイクロ流路系を介して添加し、センサー表面上で起こる分子の結合、解離によって生じる微量な質量変化を、SPR シグナルの変化としてリアルタイムにモニターできる装置であり、シグナル伝達、レセプターとリガンドの結合様式、遺伝子発現の調節機構等様々な分野で利用されるようになってきた。一方、バイオコンジュゲート体の比活性低下について、これまで、修飾高分子の立体障害によるレセプター結合阻害が考えられてきたが、これまでの所、バイオコンジュゲート体とレセプターとの相互作用が詳細に検討されてきた例はない。そこで次に、この BIAcore を用いて、DIVEMA-TNF- α の Receptor affinity の検討を試みた。TNF レセプター (p55) の固定化は、センサー表面上のカルボキシルメチルデキストランを N-ヒドロキシサクシイミド基で活性化し、TNF レセプターのアミノ基と反応させることにより行った。今回用いた条件では、センサーチップのフローセルへの固定化量は、約 1860 RU であった。このフローセルに native TNF- α 及び DIVEMA-TNF- α (TNF- α 濃度として 200 nM~1.56 nM) をインジェクションする事で、レセプターとの相互作用を検討した。TNF レセプターを固定化していないフローセルでは、相互作用は認められなかったのに対し、固定化したフローセルでは、インジェクションとともに速やかに TNF- α がレセプターに結合していくのが観察された。このセンサーグラムより、レセプターへの結合量を求め、種々の濃度での結合量 R_{eq} を TNF- α 濃度に対してプロットした。これより、平衡定数 K_D 及び最大結合量 R_{max} を BIA evaluation 3.0 program を用いて算出した。まず、Fr. 1 及び Fr. 2 で K_D を比較すると、DMMA(+)群、(-)群に関わらず Fr. 2 の方が K_D が小さく、Affinity が高かった。これは、in vitro における比活性と相関しており、Receptor affinity の低下が、in vitro で Fr. 1 の比活性低下の原因の一つとなっていると考えられた。しかし DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 1 では、Receptor affinity は DIVEMA-TNF- α (-) Fr. 1、Fr. 2 と比較して高いにも関わらず、in vitro 比活性はそれらと同程度であった。この点に関しては、今後詳細な検討が必要であるが、Receptor affinity が高いのは、DMMA で TNF- α のレセプターとの結合に重要な部分を保護した事を示唆する結果であるとも考えられる。さらに、Receptor affinity の相違が、DIVEMA-TNF- α Fr. 1 において、DMMA(+)群、(-)群とも比活性が同じであるにも関わらず、in vivo における抗腫瘍効果が DIVEMA-TNF- α (+)でのみ認められた原因である可能性が考えられる。つまり、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 1 では、Receptor affinity が高いために血流にさらされていてもレセプターと結合することができるが、DIVEMA-TNF- α (-)では Receptor affinity が低すぎてレセプターと結合できず、その結果、抗腫瘍効果が認められなかった可能性も考えられる。一方、native 体の K_D は、8.6 nM であったが、これは細胞を用いた場合の K_D (0.5nM 程度) と比較して高く、Affinity としては低くなっていることが分かった。この原因としては、レセプターの固定化による、レセプター自身の活性低下や、レセプターが固定化される配向性の問題等が考えられる。さらに、TNF- α 1 分子に対して、レセプター 2~3 分子が結合すると考えられており、レセプターの密度等も、親和性に影響を与えるものと考えられた。さらに、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、in vitro における活性が native 体と同程度であるにも関わらず、Receptor affinity 自体はかなり低い等、今後これらの点を含め、より詳細な検討を行っていく必要があると考えられた。また最大結合量 R_{max} についてであるが、これは結合した質量を表しているため、バイオコンジュゲート体の分子量が異なっている場合には比較できない。しかし、DIVEMA-TNF- α で同じフラクション同士を比較すると、DMMA(+)の方が R_{max} が大きく、この点からも DMMA(+)の方が Affinity が高いものと推測された。

これまで、PEG 等を用いた TNF- α の Bioconjugation の場合、抗腫瘍効果増大メカニズムとして、その体内安定性の向上ならびに腫瘍組織移行、蓄積性の増大等が判明している。そこで、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果増大メカニズムの解明を目的に、DIVEMA-TNF- α の体内動態を評価した。DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 は、native TNF- α と同様に速やかに血中から消失し、その投与半減期は 4 分程度であった。さらに、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 1 では、native 体や DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 と比較して、分子サイズとしては大きいにも関わらず、血中滞留性は逆に低下していた。これは、投与 3 時間後の臓器分布より、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 1 は特に肝臓等の組織への分布が増大している為に、血中からの消失が速かったものと考えられた。また、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 1、Fr. 2 とも、native 体と比較して肝臓、腎臓、脾臓への分布が増大していた。これは、DIVEMA 単独でそれらの組織に分布しやすくなっていることから、この DIVEMA の特性がバイオコンジュゲート体に反映されたものであると考えられた。また、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の投与 3 時間後の腫瘍組織移行性は、native 体とほとんど変わらなかった。実際の治療投与量においては、投与 24 時間後に出血壊死が認められ、透過性が亢進している事から、経時的な臓器分布、特に腫瘍組織移行性を検討せねばならないものの、以上の結果は、これまで検討を行ってきた PEG-TNF- α 等と異なり、少なくとも血中滞留性は、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果増大メカニズムには関与していない事を示唆している。また、2 次的な腫瘍組織蓄積の関与は否定できないものの、初期の腫瘍組織移行性も殆ど抗腫瘍効果増大メカニズムには関与していないものと考えられる。さらにこれらの結果は、最適の Bioconjugation 条件を予測していくには、体内安定性という点だけでなく、TNF- α の作用発現メカニズムを考慮した適切な機能付与という点も考慮する必要がある事を示していると考えられた。

以上の結果より、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果増大メカニズムは、これまでの PEG-TNF- α 等とは異なっていることが判明した。これは逆に、DIVEMA の機能が抗腫瘍効果増大メカニズムに大きく関与している可能性を示唆するものである。TNF- α は IFN- γ と相乗作用を示すことが知られていることがか

ら次に、DIVEMA の機能の中でも特に IFN- γ 誘導能に着目し、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果増大メカニズムを解明し、DIVEMA の機能性高分子としての有用性について評価を試みた。まず、in vivo における DIVEMA の IFN- γ 誘導能を検討したところ、1 mg/mouse という投与量でのみ、全身レベルでの顕著な IFN- γ 誘導が認められた。しかし、それ以下の投与量では、全く IFN- γ 誘導は認められなかった。DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 に含まれる DIVEMA 量が 3 μ g 程度である事から考えると、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 中の DIVEMA による全身レベルで IFN- γ の誘導はあまり期待できないものと予想された。しかし、サイトカインの作用を考える場合には全身レベルよりも、局所的なレベルで考える必要がある。即ち DIVEMA による IFN- γ の局所的な誘導を考えていかなければならない。IFN- γ を産出する細胞としては、NK cell や T cell が考えられるが、まず T cell に焦点を絞り、DIVEMA の作用を in vitro において検討を行った。その結果、抗体で刺激しなかった場合には、ほとんど IFN- γ の産出は認められず、DIVEMA を添加しても何ら作用を及ぼさなかった。一方、抗体で刺激することによって T cell から IFN- γ の産出が認められるようになったが、DIVEMA はこの活性化 T cell からの IFN- γ 産出を、顕著に誘導した。この IFN- γ の産出の増大が、単に DIVEMA がマイトージェンとして働き、細胞が Proliferation したためによって起こったのかを確認するために、 3 H-thymidine の取り込みに関して検討を行った。その結果、若干取り込みの上昇が認められたものの、それを考慮したとしても、DIVEMA による IFN- γ 産出の上昇は、単にマイトージェンとして働いているのではなく、T cell からの IFN- γ 産出を誘導しているものと考えられた。DIVEMA が活性化 T cell からのみ、IFN- γ の産出を誘導する理由については、DIVEMA が活性化シグナルに何らかの影響を与えているのか、抗体刺激で活性化されることによって産出される IL-2 等の存在が必要なのか等、様々な可能性が考えられるが、この点については今後詳細な検討が必要であると考えられる。しかし少なくとも担癌状態では、T cell は抗原提示を受け、活性化状態にあると考えられることから、DIVEMA の機能は癌治療において非常に有用であると考えられた。さらに、1.9 μ g/ml という低濃度でも、IFN- γ 誘導が認められる事から、これは、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果増大メカニズムに、DIVEMA の IFN- γ 誘導能が関与している可能性を示唆するものであると考えられた。

Bioconjugation によってサイトカインのインテリジェント化を図り、サイトカイン療法を最適化していくには、様々な機能を有する修飾高分子の開発も必要となってくる。我々はこれまで、機能導入可能な幹ポリマーとして PVP の有用性を提示してきた。PVP は、PEG と同様に日本薬局方収載品であり、PEG よりも血中滞留性が長い等の利点を有しているうえ、ラジカル共重合により容易に官能基を導入でき、様々な機能導入が可能な高分子である。また、標的指向性や、DIVEMA のような薬理活性（免疫賦活化能）・薬物徐放化能等、複数の機能を導入することも可能であると考えられる。しかし、PVP を最適の修飾高分子として分子設計するためには、機能性高分子の機能-官能基特性等を詳細に評価し、実際に得られた知見をもとに、様々な機能をフィードバックしていく必要がある。TNF- α を用いた癌治療を考えた場合、DIVEMA の機能（免疫賦活化能・薬物徐放能）は非常に魅力的となる。そこで次に DIVEMA の機能特性を PVP へ導入しようを試みた。DIVEMA の生物活性には、ポリアニオンであることが必須と考えられることから、まず PVP に様々なアニオン性官能基を導入し、その修飾高分子の IFN- γ 誘導能について検討した。種々アニオン性導入 PVP を合成し、これらの活性化 T cell への作用を検討したところ、ノニオン性である PEG や PVP では、作用は認められず、アニオン性導入 PVP の中でも、DIVEMA と同様に薬物徐放性を有する PVP-MA でのみ、IFN- γ の産出の増大が認められた。さらに、これらアニオン性導入 PVP の 3 H-thymidine の取り込みに関して検討したところ、DIVEMA と同程度に取り込みの上昇が認められている。なお予備的にこの免疫賦活化能（IFN- γ 誘導能）と薬物徐放化能を有するマレイン酸導入 PVP（PVP-MA）の体内挙動を評価したところ、腎組織への標的指向性を有することが判明した。今後、マレイン酸の導入量や電荷強度と作用の関係等を詳細に検討し、機能-官能基特性を詳細に検討していく事で、新たな機能性修飾高分子の分子設計が可能になるものと期待される。現在これらの研究成果をもとに、さらに機能性・有効性・安全性に優れた機能性修飾高分子の設計とその Bioconjugation への展開を図っている。

5. まとめ

本研究は、3ヶ年で特定疾病組織への標的指向能や免疫賦活化能を有する薬物徐放性修飾高分子を新規設計し、ポストゲノム戦略に叶う「生理活性タンパク質のバイオコンジュゲート化 DDS システム」を構築しようとするものである。初年度は、特定組織（腎臓）への標的指向性と免疫賦活化能（IFN- γ 誘導能）を有した薬物徐放型修飾高分子（PVP-MA）の設計を目指し、DIVEMA の修飾高分子としての特性把握と、その Bioconjugation への応用、その評価を通じて、当初目標の新規修飾高分子（PVP-MA）を創出した。この一連の研究の中で、Bioconjugation によるサイトカインへの機能付与を目的とし、DIVEMA を用いた TNF- α の Bioconjugation を行い、有望な新規抗ガン剤候補の開発と共に、DMMAAn を用いた、活性低下を防ぐ新しい Bioconjugation 法の確立も達成できた。以下にその研究成果を要約する。

DIVEMA は Multi-sidepoint attachment 型の修飾高分子であるため、そのまま Bioconjugation に用いると、架橋等が生じ著しく活性が損なわれてしまう。そこで、pH-reversible なアミノ基保護試薬である DMMAAn を利用した新しい Bioconjugation 法の確立を試みた。その結果、DMMAAn で修飾率を制御した DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、in vitro での比活性低下が殆ど観察されず、DMMAAn が活性発現部位をうまく保護した可能性が示唆された。さらに、in vivo においても、DMMAAn で修飾率を制御した場合にのみ、抗腫瘍効果の増強が認められたことから、DMMAAn を用いた新しい Bioconjugation 法の有用性が示唆された。最も in vivo での抗腫瘍効果の高かった DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の薬物治療への応用を試みたところ、

週 2 回計 4 回の頻回投与において、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、わずか 50 JRU でも 100 %に近い完全治癒率が得られた。一方、native TNF- α では、約半数が突然死する 10,000 JRU の投与でも、33 例中 8 例の完全治癒しか得られず、抗腫瘍効果が僅かながらも認められる投与量では、体重減少、血小板減少、肝障害等の副作用を避けることはできなかった。一方 DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、そのような副作用は全く認められず、TNF- α の抗腫瘍作用と副作用とが格段に分離されており、その新規抗ガン剤としての有用性が示唆された。DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 の抗腫瘍効果増強メカニズムを解明するため、各種生体内諸因子との相互作用を検討した。レセプターとの相互作用の検討より、Bioconjugation によって修飾高分子が形成する立体障害によって、Receptor affinity が低下し、それに伴い、in vitro の比活性が低下する傾向が認められた。しかし、比活性低下は Receptor affinity にのみ影響を受けるものではないことも同時に明らかとなった。さらに、DMMAAn を用いた場合に、Receptor affinity が高かったことから、DMMAAn が Receptor との結合部位をうまく保護した可能性が示唆された。DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 では、これまで PEG-TNF- α 等で報告したような、プロテアーゼ抵抗性の上昇、血中滞留性の向上並びに腫瘍組織移行性の増大等は認められず、これまでのバイオコンジュゲート体とは異なったメカニズムで抗腫瘍効果が増強されているものと考えられた。そこで、DIVEMA の IFN- γ 誘導能に着目し、DIVEMA の T cell に対する作用を検討したところ、DIVEMA は活性化 T cell からの IFN- γ の産出を顕著に誘導し、DIVEMA の癌治療における機能性修飾高分子としての有用性が示唆された。さらに、この作用は 1.9 μ g/ml という低濃度でも認められ、DIVEMA-TNF- α (+) Fr. 2 にこの DIVEMA の機能が付与されている可能性が期待できる結果であった。以上 DIVEMA-TNF- α と生体内因子との相互作用の検討から、最適の Bioconjugation 条件は、体内安定性だけでなく、適切な機能付与という点をも考慮する必要があると考えられた。今後、最適の Bioconjugation 設計を確立していくには、さらにこれらの基礎的な情報を蓄積していくことで、最適の Bioconjugation 条件を予測できるようにならなければならない。最後にアニオン性官能基を導入することによって、DIVEMA の IFN- γ 誘導能や薬物徐放化能を PVP へ導入しようと試みた。アニオン性官能基として、マレイン酸を導入することによって、活性化 T cell からの IFN- γ の産出が増大する傾向が認められた。このマレイン酸導入 PVP (PVP-MA) は腎臓への特異的集積性をも有していた。今後、導入量や構造-活性相関等を詳細に検討し、それらの基礎的データを積み上げていくことで、PVP への様々な機能導入が可能になり、それにより癌治療を目的とした最適の修飾高分子を設計できるものと期待される。TNF- α をはじめとする、サイトカインの多くはその強力な作用が注目され、臨床応用が盛んに試みられてきたが、避けがたい副作用のために期待された効果は得られていない。本来サイトカインは、必要なときに必要な量が標的部位のみに供給されることによって、ホメオスタシスを保った状態で生理作用を発現しているのであり、これらを薬物として用いる際には、緻密な動態制御等により、サイトカイン自身をインテリジェント化する必要がある。Bioconjugation は、単に体内安定性を改善するだけでなく、適切な修飾高分子を選択することによって、様々な機能を付与する事が可能であると考えられる事から、次世代の薬物治療を担う DDS になり得るものと期待される。そのためには、様々な機能を有した修飾高分子の開発、最適の修飾高分子の選択法の確立等が必要になってくる。さらにその上で、修飾部位の制御法の開発、水溶液中での立体構造の把握、種々の生体内諸因子との相互作用の把握等により、最適の Bioconjugation 設計を確立していかなければならない。それらを統合していくことで、Bioconjugation による薬物治療の最適化が成し遂げられるものと考えられる。次年度以降、これらの研究成果をもとに、さらに機能性・有効性・安全性に優れた機能性修飾高分子の設計とその Bioconjugation への展開を図っていく予定である。

6. 研究発表

1. Tsunoda S., Ishikawa T., Watanabe M., Kamada H., Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Hirano T., and Mayumi T. : Selective enhancement of thrombopoietic activity of PEGylated interleukin 6 by a simple procedure using a reversible amino-protective reagent., Br. J. Haematol., 112, 181-188, 2001.

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社