

## 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

蛋白質による疾病治療の最適化の観点から、腎臓への選択的移行能を有した新規修飾高分子等を開発し、腎疾患に対するターゲティング療法を確立し得た。また従来までのバイオコンジュゲーションの問題点を克服した新規方法論を構築し、その有用性を認めた。

### 1. 研究目的

近年、種々難治性疾患に対する抗体療法等が 21 世紀医療として台頭してきたことも相俟って、疾病治療に有望な蛋白質を探索・同定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。周知の通り、20 世紀後半には数多くの蛋白質が同定され、“夢の治療薬”として期待されてきた。しかし通常、蛋白質は生体内安定性に極めて乏しいため、臨床応用しようとする際には大量頻回投与を余儀なくされ、必然的に重篤な副作用を招いてしまう。また一般にサイトカイン等の蛋白質は、複数のレセプターを介して多様な *in vivo* 生理活性を示すため、目的とする治療作用のみならず、副作用の原因となる他の作用までも同時に発揮してしまう。そのため、蛋白質の臨床応用は未だ著しく制限されている。これら数多くの過去の事例が忘れ去られたかのように、プロテオーム創薬や 21 世紀医療というキーワードのみが独り歩きしているのが現状である。従って種々蛋白質を有効な医薬品として開発していくためには、上述した蛋白質固有の問題点を克服し得る創薬テクノロジーの確立が不可欠となってくる。この創薬テクノロジーは、蛋白質による疾病治療の最適化を目指した DDS (Drug Delivery System; 薬物送達法) であり、ポストゲノム基礎研究と 21 世紀医療との架け橋となるトランスレーショナル・リサーチに叶うものである。

本観点から最近、数ある DDS の中でも蛋白質の生体内安定性の向上を目的に、ポリエチレングリコール (PEG) 等の水溶性高分子を蛋白質に結合させる、バイオコンジュゲーションが特に注目されており、PEG 化インターフェロン  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) 等、画期的な蛋白質製剤が臨床展開されるようになってきた。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一部に限局されている。これは主として、1) PEG 等の非電荷水溶性高分子を用いたバイオコンジュゲーションの場合、修飾高分子-蛋白質複合体形成に伴い、分子サイズが増大し、腎排泄速度の低下等による血中滞留性増大が達成し得る一方で、血中から組織への移行性が低下してしまうこと、2) 蛋白質に結合した修飾高分子が、立体障害的にプロテアーゼによる分解から蛋白質を保護する一方で、リガンド-レセプター結合形成をも阻害してしまい、比活性が低下してしまうこと、3) 従来までの N 末端アミノ基とリジンアミノ基を標的としたランダムなバイオコンジュゲーションでは、活性発現に重要なアミノ基にまで高分子導入してしまい、比活性低下を避け得ないこと等に起因している。

これらバイオコンジュゲーションの問題の中で、2) に関しては既に、①蛋白質の作用機序を考慮し、最適の修飾高分子を選択した上で、②比活性-修飾率-分子サイズ等の相関を詳細に検討し、最適のバイオコンジュゲーション条件を見出すことで、*in vitro* における比活性低下は避け得ないものの、③蛋白質の生体内安定性や血中滞留性を飛躍的に向上させ得ること、④比活性-生体内安定性-組織移行性のバランスを最適化することで、多様な *in vivo* 作用の中から、目的とする治療作用のみを数百倍にも高め得ることを明らかとしてきた。そこで本研究は、残されたバイオコンジュゲーションの問題点、1) と 3) を解決できる方法論を構築し、ポストゲノム戦略としてのプロテオーム創薬や 21 世紀医療の推進を図ろうとするものである。

### 2. 研究方法

**【機能性修飾高分子の合成とその評価】** ポリビニルピロリドン (PVP) を幹高分子とする種々誘導体は、ラジカル共重合法により作製し、ゲル濾過 HPLC により分取精製した。これら PVP 誘導体の細胞内への取り込みは、アミノアセトフルオレッセンにより蛍光ラベルした PVP 誘導体を供した。またマウス尾静脈投与後の生体内挙動は、<sup>125</sup>I ラベル化体を用いた。

**【機能性修飾高分子による蛋白質のバイオコンジュゲーションとその評価】** PVP 誘導体によるバイオコンジュゲーションは、蛋白質のアミノ基 (リジン ε アミノ基および N 末端 α アミノ基) とアミド結合を形成させることにより行った。修飾高分子 (PVP 誘導体: Mw 10kDa) の蛋白質への導入率 (修飾率) は、フルオレスカミン法により評価した。Superoxide dismutase (SOD) の in vitro 比活性は、チトクロム C 法により検討した。バイオコンジュゲート化 SOD の in vivo 治療効果は、HgCl<sub>2</sub> 誘発急性腎炎モデルにより評価した。

**【ジメチル無水マレイン酸 (DMMA) による高分子導入部位の制御とその評価】** DMMA (pH 応答性のアミノ基保護試薬) による腫瘍壊死因子 (TNF-α) の表面アミノ基保護は、pH8.5 の条件下で行い、引き続いてジビニル無水マレイン酸共重合体 (DIVEMA: Mw 30kDa) や PEG (Mw 5kDa) によりバイオコンジュゲーションした。その後 pH を 6.0 に調整し、バイオコンジュゲート化 TNF-α に結合した DMMA を解離させた。バイオコンジュゲート化 TNF-α への高分子導入率はフルオレスカミン法により計測し、その in vitro 比活性は TNF-α に感受性の LM 細胞を用いた細胞傷害性試験により検討した。in vivo 抗腫瘍効果は、Meth-A 繊維芽肉腫を皮内移植したマウスに静脈内投与することで評価した。

### 3. 研究成果・考察

バイオコンジュゲーションを次世代創薬テクノロジーとしてシステム・アップするためには、①特定組織への標的指向能 (ターゲティング能) 等を有するインテリジェントな機能性修飾高分子を開発し、バイオコンジュゲーションによる組織移行性の低下を改善すること、②蛋白質への修飾高分子の導入部位 (結合部位) を制御し、バイオコンジュゲーションの致命的な欠点である”活性発現部位への高分子導入による比活性低下”を防ぐことが必須となる。このうち①に関しては、病巣へのターゲティング能のみならず、病変組織の pH 変化等をセンサーし、薬物濃度をコントロールできる pH 応答性薬物徐放化能や、薬物としての蛋白質機能を相乗的に高め得る免疫賦活化能を有する機能性修飾高分子を開発することで、蛋白質の生体内挙動・作用をより緻密に制御できることになり、ひいては蛋白質による疾病治療の有効性と安全性をさらに確保できることになる。本観点から平成 13・14 年度に推進した研究の成果を以下に示した。

**【インテリジェント化修飾高分子の開発とその評価】** バイオコンジュゲート化蛋白質の生体内挙動は、その表面を覆う修飾高分子の電荷や親水-疎水バランス等の物理化学的性質によって運命付けられる。そのため非電荷両親媒性高分子の PEG は、血中滞留性の向上や肝臓等への移行性の低下を目的としたバイオコンジュゲーション (PEGylation) には適しているものの、血中から病態組織に移行して初めて薬効を発揮する蛋白質のバイオコンジュゲーションには不適當となってしまう。そのうえ PEG は、その構造上新たな機能性官能基の導入が困難であり、疾病組織へのターゲティング能等の付加価値を付与し得ない。この点ポリビニルピロリドン (PVP) は、ラジカル共重合法によって容易に種々の機能性官能基を導入し得るうえ、日本薬局方収載の安全性に優れた水溶性高分子である。また我々の検討から、血中滞留性の向上を目的とした蛋白質のバイオコンジュゲーションにおいては、PEG よりも遙かに優れた修飾高分子であることが判明している。以上の観点から平成 13 年度は、この PVP を幹高分子として種々 PVP 誘導体を作製したところ、PVP にアニオン性官能基 (マレイン酸) を導入した PVP-MA が T 細胞を活性化し、インターフェロン γ (IFN-γ) 産生を誘導できること、薬物徐放化能を有していること、腎臓への指向性を有していることが判明した。また疎水性残基 (ラウリル基) を導入した PVP-LA は脾臓への高い指向性を有していた。これら知見を基盤として平成 14 年度は、腎臓へのターゲティング能を有した修飾高分子の開発に焦点を絞り、マレイン酸類縁体 (シトラコン酸、DMMA) 等を導入した PVP 誘導体を新規合成し、その特性評価を試みた。その結果、PVP に DMMA を導入した PVP-DMMA が際だって優れた腎指向性を有していることが判明した。この PVP-DMMA を種々系統のマウスに尾静脈内投与したところ、僅か数分で投与量の約 30% が腎臓に集積し、投与後数時間~24 時間では投与量の約 80% もが腎臓へ選択的に滞留することが明らかとなった。また徐々に尿中排泄されるものの、投与後 96 時間後においても投与量の約半分が腎臓に滞留していた。この PVP-DMMA の in vitro 毒性試験を試みた結果、10mg/ml でもヒト正常腎上皮細胞やヒト血管内皮細胞に何ら傷害性を示さないことが判明した。また 10mg の PVP-DMMA をマウスに連日 28 日間、in vivo 投与 (合計

280mg) しても、腎臓を含む各組織に何ら傷害を及ぼさないことを病理解析等で認めている等、PVP-DMMA<sub>n</sub> が高い安全性を有した腎ターゲットキャリアとなり得ることが明らかとなった。

現在腎疾患が世界的に急増しており、米国だけでも 1100 万人以上もの患者がいる。これら腎疾患患者の多くは、将来的に腎機能不全へと陥ってしまい、生命維持のため、透析もしくは腎移植に頼らざるを得なくなる。周知の通り、透析や腎移植は患者の QOL に多くの問題を抱えているうえ、米国ではこれら両処置を受けてさえ、毎年 6 万人の患者が死に至っている。そのため、米国保健研究所 (National Institutes of Health) は、新たな腎疾患治療戦略の早期創出を強く訴えている。本観点から近年、腎臓への選択的な薬物送達システム (DDS) の確立が待望されており、アビジンやライソザイム等を薬物キャリアとして適用したアプローチが進められている。しかしこれらキャリアは、抗原性や腎臓への到達性の乏しさ等から、十分な成果が認められていない。一方で現在、種々腎疾患にステロイド剤や免疫抑制剤等が対処療法剤として汎用されている。しかしこれら薬剤は、強烈な毒性を有するうえ、その *in vivo* での症状緩和作用も疑問視されており、新たな治療薬の開発が急がれている。そのため近年 SOD や Transforming growth factor 等の蛋白質を腎疾患治療薬として適用しようとする試みが注目されているが、上述した蛋白質固有の問題 (腎臓への移行性の低さや作用の多様性など) が残されたままである。以上の背景から、本研究では PVP-DMMA<sub>n</sub> による SOD のバイオコンジュゲーションを試みた。その結果、未修飾 SOD や PEG 化 SOD は殆ど腎臓に集積しないにも関わらず、PVP-DMMA<sub>n</sub> によってバイオコンジュゲート化された SOD (PVP-DMMA<sub>n</sub> 化 SOD) は静脈内投与後、選択的かつ速やかに腎臓へ高集積すること、またその生体内安定性も飛躍的に向上していることが判明した。この PVP-DMMA<sub>n</sub> 化 SOD の腎疾患に対する有効性 (治療効果) と安全性の評価を目的に、HgCl<sub>2</sub> 誘発急性腎炎モデルマウスに静脈内投与した。その結果、未修飾 SOD や PEG 化 SOD は何ら有効性を示さなかったが、PVP-DMMA<sub>n</sub> 化 SOD は副作用を呈することなく、著しい治療効果を発揮した。本知見は、PVP-DMMA<sub>n</sub> を用いた蛋白質のバイオコンジュゲーションと腎ターゲット療法の有用性を強く示すものである。現在、PVP-DMMA<sub>n</sub> のさらなる特性解明と PVP-DMMA<sub>n</sub> 化 SOD の腎疾患へのトランスレーショナル・リサーチの推進を図っている。(上記成果は投稿済みである: *Nature Biotechnology*, in press: 研究発表①)

【蛋白質への修飾高分子導入部位制御システムの構築とその評価】 現在、一般に行われているバイオコンジュゲーションの多くはアミノ基 (リジン残基の有する ε アミノ基及び N 末端の α アミノ基) をターゲットとしたものであるが、この方法ではその結合がランダムであり、活性発現に重要なリジン残基まで修飾されてしまうため、必然的に活性低下を招いてしまう。この方法は、反応条件が緩和なうえ、反応効率の点で最も優れており、高い収率でバイオコンジュゲート体が得られる。しかし、修飾高分子のアミノ基への結合はランダムでしかなく、その結合部位を厳密に制御することは出来ない。殆どの蛋白質においてリジン残基は高次構造の形成やリガンド-レセプター間結合に必須の役割を担っている。そのため、これらリジン残基への高分子導入により、必然的に著しい比活性低下を招いてしまう。またランダムに修飾高分子が導入されるため、得られたバイオコンジュゲート体は、様々な部位に種々個数の修飾高分子が結合した、分子的に不均一な混合物となり、比活性などの機能面でヘテロな集団となる。本観点から遺伝子工学的にシステイン残基を導入した変異蛋白質を作製し、遊離のチオール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法が考案されてきた。しかし一般に、フォールディングに重要な役割を担うチオール基の人為的導入は往々にして、蛋白質の立体構造変化や蛋白質間凝集を招いてしまい、予期せぬ活性低下が生じてしまう。そのうえ活性を保持したシステイン残基導入変異蛋白質が作製でき、部位特異的バイオコンジュゲーションが可能となった場合でも、チオール基への高分子導入効率の低さから、十分な収率でバイオコンジュゲート体が得られない。そのため、これら問題を克服した新規バイオコンジュゲーション法の確立が必須となっている。以上の観点から、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効率の良い新たなバイオコンジュゲーション方法の開発を試みた。抗腫瘍サイトカインとして期待される TNF-α は、分子内に 6 個 (三量体として 18 個) のリジン残基を有しており、なかでも、Lys11 が三量体形成や立体構造の維持に、Lys90 がレセプター結合に重要な役割を担っていることが点突然解析により判明している。そこでまず、修飾部位を制御し、比活性低下を回避するバイオコンジュゲーション・システムの開発を目指した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である DMMA<sub>n</sub> を用いた簡便な修飾部位制御法の開発とその評価を行った。即ち本方法では、活性発現に重要な役割を果たしている Lys11 や Lys90 が TNF-α 分子表面に存在し、立体的に外側に配位していること、これら活性発現に重要な役割を果たすアミノ基は反応性に富んでいることから、予めこれらのアミノ基を DMMA<sub>n</sub> で保護しておいた後、修飾高分子を残存するア

ミノ基に対して導入し、その後再び DMMAAn を解離させることにより、これら活性発現に重要なリジン残基への修飾高分子の導入を防げるものと期待した。TNF- $\alpha$  のバイオコンジュゲーションは、endpoint attachment 型の PEG および multi-sidepoint attachment (ペンダント) 型の DIVEMA を用いて行った。その結果いずれの修飾高分子を用いた場合でも、従来法で作製したバイオコンジュゲート体と比較して、DMMAAn を用いることで、比活性の大幅な改善が認められ、活性発現部位への高分子導入による比活性低下の問題を解決し得ることが示唆された。以上、DMMAAn はランダムにアミノ基と反応するが、反応条件(添加量)を調節することで、まず優先的に活性発現に重要なリジン残基を保護し得たものと考えられた。次にこれらバイオコンジュゲート化 TNF- $\alpha$  の in vivo 抗腫瘍効果を検討した。その結果、いずれも副作用を呈することなく、目的とする抗腫瘍効果のみが 100 倍以上(未修飾体との比較)、数倍以上(従来法で作製したバイオコンジュゲート体との比較)にも向上していることが判明した。以上の事実は、DMMAAn によって、修飾部位を制御し、比活性を改善することによって、in vivo における治療作用を効率よく引き出せることを示している。従って、これまでバイオコンジュゲーションによって、その作用を引き出し得なかった蛋白質に対して、修飾部位を制御し比活性低下を改善することにより、有効性と安全性に優れたバイオコンジュゲート化蛋白質が創出し得るものと考えられた。しかし DMMAAn を用いたバイオコンジュゲーションは、トライ・アンド・エラーの積み重ねによる条件設定を要するうえ、得られたバイオコンジュゲート体は比活性に優れているとはいえ、分子的にヘテロな集団でしかない。一方で我々は近年、独自のファージ表面提示法を駆使することで蛋白質創薬シーズの構造変異体を Combinatorial Biosynthesis し、この 10 億種類以上もの多様性を有するライブラリの中から、医薬価値に優れた機能性人工蛋白質を迅速かつ効率良く創出し得る方法論を構築した。上述したように蛋白質中のリジン残基は、蛋白質の高次構造形成やリガンド-レセプター結合等に重要な役割を担っている。TNF- $\alpha$  も、その Lys11・Lys90 が立体構造形成やレセプター結合に必須と言われてきた。しかし我々はこの既成概念を覆す知見、即ち Lys11・Lys90 を含む全てのリジン残基を一挙に他のアミノ酸へ置換しても、wild 型と同等もしくは 3 倍以上ものレセプター親和性や生物活性を有するリジン欠損体を創出し得ている。この活性を完全に保持したリジン欠損 TNF- $\alpha$  を用い、その 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試みたところ、分子的均一性に優れた部位特異的モノ PEG 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  が高収率で得られた。この部位特異的モノ PEG 化リジン欠損 TNF- $\alpha$  は、未修飾 TNF- $\alpha$  と同程度の比活性を保持していたことから、従来までのバイオコンジュゲーションの問題を全て克服し得たものと考えられた。現在、本方法論のさらなる最適化と有用性評価をさらに進めている。(上記成果は投稿済みである: *Nature Biotechnology*, in press: 研究発表②)

#### 4. まとめ

抗体療法やサイトカイン療法といった 21 世紀医療とプロテオーム創薬を推進し得る基盤的創薬テクノロジーとしての高分子バイオコンジュゲーションをシステム・アップするため、平成 13・14 年度は 1) バイオコンジュゲート化蛋白質の生体挙動・作用を緻密に制御し得る修飾高分子の開発と、2) 活性発現部位への高分子導入による避け得ない比活性低下を克服し得る新規バイオコンジュゲーション法の確立を図った。その結果、宿主の免疫系を効率よく活性化し、かつ薬物徐放化能を有する修飾高分子(PVP-MA)や脾臓への選択的移行能を有する PVP-LA などを新規合成できた。特に PVP-DMMAAn は、際だった腎移行・蓄積性を有したターゲティングキャリアであり、腎疾患に対する新たな DDS 療法への応用が強く期待された。一方で DMMAAn を用いた修飾部位制御法は、比活性保持の観点で優れたバイオコンジュゲーション・システムとなり得ることが判明した。また、ファージ表面提示法を駆使したリジン欠損体の創出とその部位特異的バイオコンジュゲーションは従来までのバイオコンジュゲーションの問題点を一挙に解決できる新たな基盤技術となり得ることが示唆された。平成 15 年度は、これら研究成果をもとに、バイオコンジュゲーションをさらにシステム・アップしていく予定である。

#### 5. 研究発表

##### 紙上発表

- ① Kamada H., **Tsutsumi Y.**, Sato-Kamada K., Yamamoto Y., Yoshioka Y., Okamoto T., Nakagawa S., Nagata S., and Mayumi T. : Synthesis of poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride) co-polymer and its application as a renal targeting carrier., *Nature Biotechnology*, in press.

- ② Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., and Mayumi T. : Creation of lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity using phage libraries produces a novel PEGylation system., *Nature Biotechnology*, in press.
- ③ 堤 康央, 真弓忠範 : プロテオーム創薬に叶う機能性人工蛋白質の迅速創出とその PEGylation への展開., *蛋白質核酸酵素*, in press.
- ④ 堤 康央, 真弓忠範 : 高分子化医薬 (PEG 化製剤) ., *血液・免疫・腫瘍*, in press.
- ⑤ Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Mayumi T. : Molecular design of bioconjugated cell adhesion peptide with a water-soluble polymeric modifier for enhancement of antimetastatic effect., *Current Drug Targets*, 3 (2): 123-130, 2002.
- ⑥ 山本陽子, 堤 康央, 中川晋作, 真弓忠範 : フェージディスプレイシステムを利用した部位特異的 PEGylation., *Drug Delivery System*, 17, 427-434, 2002.
- ⑦ 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.

口頭発表

- ⑨ 柴田寛子, 吉岡靖雄, 小林恭子, 岡本貴行, 堤 康央, 中川晋作, 真弓忠範 : フェージ表面提示法を駆使した部位特異的バイオコンジュゲーションの最適化., 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 2003 年 3 月.
- ⑩ 清水智絵, 吉岡靖雄, 小林恭子, 吉川友章, 岡本貴行, 柴田寛子, 堤 康央, 中川晋作, 真弓忠範 : 医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の設計戦略の確立に向けて-1., 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 2003 年 3 月.
- ⑪ 吉川友章, 吉岡靖雄, 小林恭子, 岡本貴行, 柴田寛子, 清水智絵, 堤 康央, 中川晋作, 真弓忠範 : 医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の設計戦略の確立に向けて-2., 日本薬学会第 123 年会, 長崎, 2003 年 3 月.
- ⑫ 吉岡靖雄, 堤 康央, 山本陽子, 中川晋作, 真弓忠範 : 目的とする生理活性を完全に保持したりジン欠損機能性蛋白質の迅速構築とその DDS への応用, フェーマ・パイオフォーラム 2002, 東京, 2002 年 11 月.
- ⑬ 吉岡靖雄, 堤 康央, 山本陽子, 中川晋作, 真弓忠範 : 部位特異的バイオコンジュゲーション・システムの構築～リジン欠損 TNF- $\alpha$  変異体の作製とその評価～, 第 60 会日本癌学会, 横浜, 2002 年 9 月.
- ⑭ 小林恭子, 山本陽子, 西端俊秀, 清水智絵, 堤 康央, 中川晋作, 真弓忠範 : フェージディスプレイシステムを用いた有効な生理活性蛋白質の創出., 第 18 回日本 DDS 学会, 札幌, 2002 年 6 月.
- ⑮ 堤 康央 : 21 世紀医療を支える創薬戦略., 第 2 回阪大薬学部卒後研修会, 大阪, 2002 年 6 月.
- ⑯ 山本陽子, 西端俊秀, 小林恭子, 清水智絵, 堤 康央, 中川晋作, 真弓忠範 : Phage display system を利用した部位特異的バイオコンジュゲーション法の開発., 日本薬学会第 122 年会, 千葉, 2002 年 3 月.
- ⑰ 山本陽子, 鎌田春彦, 鎌田恵子, 堤 康央, 中川晋作, 真弓忠範 : 薬物治療の最適化を充たす次世代バイオコンジュゲート DDS の確立にむけて., 第 17 回日本 DDS 学会, 大阪, 2001 年 7 月.

6. 知的所有権の取得状況

- |           |        |
|-----------|--------|
| 1) 特許取得   | 特記事項無し |
| 2) 実用新案登録 | 特記事項無し |
| 3) その他    | 特記事項無し |