

examined the therapeutic efficacy of conjugate between PVD and ADR [63]. PVD (1:20) was radically synthesized with DMMA and VP in a ratio of 1:20. PVD (1:20) also had a

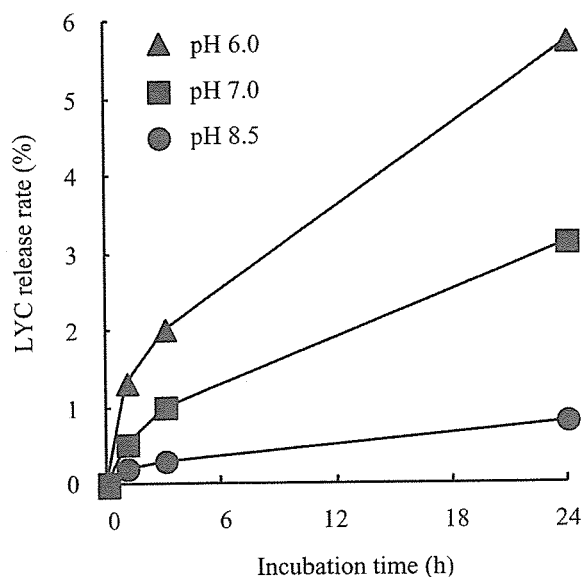


Fig. (6). pH-sensitive controlled release of Lucifer yellow cadaverine (LYC) from the conjugates between PVD (1:20) and LYC [63].

long plasma half-life as well as PVP, rather than PEG. Unlike in the case of PVD (1:5), which selectively accumulated in the kidneys, the tissue distribution of PVD (1:20) was extremely restricted. We show here that the PVD (1:20)-conjugated ADR showed superior antitumor activity against S-180 sarcomas in mice and had less side effects than free ADR (Fig. 7 and Table 1). As shown in Fig. 7, all of the mice administered with free ADR at a dose of 600 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ and 200 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ died within 6–10 days after their intravenous injection (within 13 days or 17 days after tumor inoculation) because of toxicity of ADR. There was a marked weight loss in these mice after the high dose of free ADR. In mice treated with free ADR at a dose of 60 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, although tumor growth was slightly inhibited without causing sudden death or weight loss, complete tumor regression, defined as disappearance of tumor without regrowth within 100 days, was not observed. In contrast, the antitumor activity of PVD (1:20)-ADR at a dose of 60 μg ADR/mouse was more effective than that of free ADR at 60 $\mu\text{g}/\text{mouse}$. Tumor growth was remarkably and completely inhibited by PVD (1:20)-ADR at a dose of 200 μg ADR/mouse and 600 μg ADR/mouse. Complete tumor regression was observed in 75%, 25%, and 25% of mice treated with PVD (1:20)-ADR at a dose of 600 μg ADR/mouse, 200 μg ADR/mouse, and 60 μg ADR/mouse, respectively. During the experimental period, all doses of PVD (1:20)-ADR were well tolerated, and no loss in body weight was observed. Overall, the therapeutic window is markedly increased. These results have important clinical implications for the use of antitumor chemotherapeutic agents in patients. The expansion of the therapeutic window is probably due to the following reasons. PVD (1:20)-ADR may preferentially accumulate in solid

tumors due to the EPR effect. Additionally, as it is known that pH of tumor tissues is slightly lower than that of normal tissues, the PVD (1:20)-ADR is likely to release free ADR more efficiently in tumor tissues. These results indicate that PVD (1:20) is an effective polymeric carrier for cancer therapy, accordingly it would be expected the clinical application of PVD (1:20)-conjugated cytokines as antitumor agents.

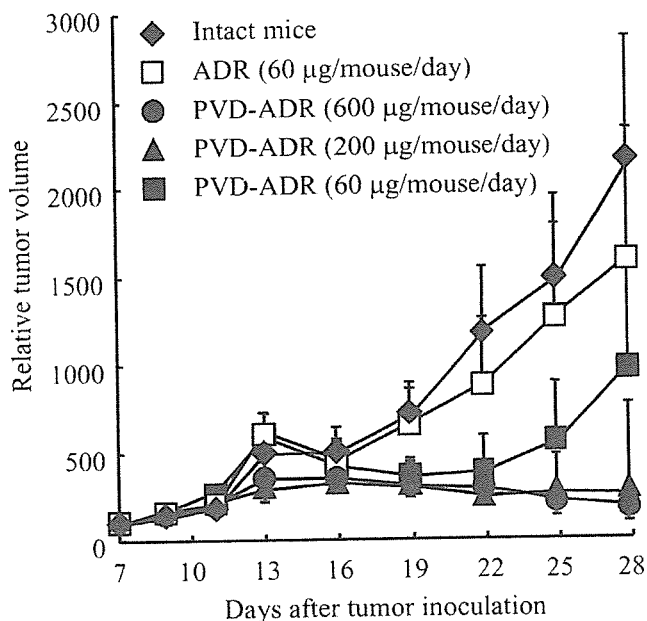


Fig. (7). Antitumor effect of Adriamycin (ADR) and PVD (1:20)-ADR on sarcoma-180 solid tumors [63].

Table 1. Antitumor Effect of ADR and PVD (1:20)-ADR on Sarcoma-180 Solid Tumors [63]

Agent	Dose ($\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$)	Complete regression
ADR	600	All mice died until 13 days
	200	All mice died until 17 days
	60	0/4
PVD (1:20)-ADR	600	3/4
	200	1/4
	60	1/4

Complete regression was defined when tumor was not regrown for >100days.

SUMMARY

In this review, we have showed the usefulness of bioconjugation for DDS to selectively enhance desirable therapeutic activities of bioactive proteins without increasing their side effects. The following sequential and multiple strategies are required for the optimization of protein therapy based on bioconjugation: (a) optimum selection of the polymeric modifier by considering the disposition of the drugs and objectives such as targeting or controlled release; (b) bioconjugation based on the estimation of characteristics such as molecular size, modification site, degree of modification,

and specific activity; and (c) assessment of therapeutic effects and pharmacokinetics of bioconjugated drugs. This fundamental approach will enable the establishment of such a methodology of bioconjugation. It may facilitate optimum molecular design of a polymeric modifier in DDS.

On the other hand, to further optimize protein therapy, it is necessary to develop a system to create mutant proteins (muted proteins) with desired properties, such as superior bioactivity. Recently, we developed the efficient way to create desired muted proteins by phage display technique. Using this technique, we created a lysine-deficient mutant TNF- α , in which all of the lysine residues were replaced with other amino acids, with full bioactivity and attempted site-specific PEGylation at its N-terminus [64,65]. In most cases, PEGylation occurs randomly at multiple lysine residues in the proteins, some of which may be located in or near the protein active site. Accordingly, the bioactivity of randomly PEGylated wild-type TNF- α is markedly lower than of the unmodified TNF- α . But then, this N-terminal mono-PEGylated mutant TNF- α had comparable bioactivity to unmodified TNF- α *in vitro*, other properties including plasma half-life, antitumor activity, and toxicity were greatly improved. This protein-drug innovation system will open the new way for promotion of protein therapy, by applying the technique of optimal bioconjugation as described in this review.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported partly by a Grant-in-Aid for Scientific Research (Nos. 17689008, 17016084, 17790135, 16790534) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan, by a Health and Labour Sciences Research Grant from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, and a research grant from NEDO.

ABBREVIATIONS

ADR	=	Adriamycin
DDS	=	Drug Delivery System
DMMA	=	Dimethyl maleic anhydride
EPR	=	Enhanced Permeability and Retention
IL-6	=	Interleukin-6
MA	=	Maleic anhydride
MRT	=	Mean residence time
PAAM	=	Polyacrylamide
PEG	=	Polyethylene glycol
PEG-ADA	=	PEGylated adenosine deaminase
PEG-Asp	=	PEGylated asparaginase
PEG-G-CSF	=	PEGylated granulocyte-colony stimulating factor
PEG-IFN- α	=	PEGylated interferon-alpha
PEG-IL-2	=	PEGylated Interleukin-2
PDAAM	=	Polydimethylacrylamide
PVA	=	Polyvinyl alcohol

PVD	=	Poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride)
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
SMANCS	=	Poly(styrene-co-maleic acid)-conjugated neocarzinostatin
SOD	=	Superoxide dismutase
TNF- α	=	Tumor necrosis factor-alpha
VP	=	Vinylpyrrolidone
WSS	=	Water-soluble synthetic

REFERENCES

- [1] Rosenberg, S. A.; Lotze, M. T.; Muul, L. M.; Chang, A. E.; Avis, F. P.; Leitman, S.; Linehan, W. M.; Robertson, C. N.; Lee, R. E.; Rubin, J. T.; Seipp, C. A.; Simpson, C. G.; White, D. E. *N. Engl. J. Med.*, **1987**, *316*, 889.
- [2] Waters, C. A.; Schimke, P. A.; Snider, C. E.; Itoh, K.; Smith, K. A.; Nichols, J. C.; Strom, T. B.; Murphy, J. R. *Eur. J. Immunol.*, **1990**, *20*, 785.
- [3] Furman, W. L.; Strother, D.; McClain, K.; Bell, B.; Leventhal, B.; Pratt, C. B. *J. Clin. Oncol.*, **1993**, *11*, 2205.
- [4] Mohler, K. M.; Torrance, D. S.; Smith, C. A.; Goodwin, R. G.; Stremmer, K. E.; Fung, V. P.; Madani, H.; Widmer, M. B. *J. Immunol.*, **1993**, *151*, 1548.
- [5] Glue, P.; Rouzier-Panis, R.; Raffanel, C.; Sabo, R.; Gupta, S. K.; Salfi, M.; Jacobs, S.; Clement, R. P. *Hepatology*, **2000**, *32*, 647.
- [6] Kreitman, R. J.; Wilson, W. H.; Bergeron, K.; Raggio, M.; Stetler-Stevenson, M.; FitzGerald, D. J.; Pastan, I. *N. Engl. J. Med.*, **2001**, *345*, 241.
- [7] Kimura, K.; Taguchi, T.; Urushizaki, I.; Ohno, R.; Abe, O.; Furue, H.; Hattori, T.; Ichihashi, H.; Inoguchi, K.; Majima, H.; Niitani, H.; Ota, K.; Saito, T.; Suga, S.; Suzuoki, Y.; Wakui, A.; Yamada, K. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1987**, *20*, 223.
- [8] Gordon, M. S.; Nemunaitis, J.; Hoffman, R.; Paquette, R. L.; Rosenfeld, C.; Manfreda, S.; Isaacs, R.; Nimer, S. D. *Blood*, **1995**, *85*, 3066.
- [9] Nagata, S. *Nat. Med.*, **2000**, *6*, 502.
- [10] Hershfield, M. S.; Buckley, R. H.; Greenberg, M. L.; Melton, A. L.; Schiff, R.; Hatem, C.; Kurtzberg, J.; Markert, M. L.; Kobayashi, R. H.; Kobayashi, A. L.; Abuchowski, A. *N. Engl. J. Med.*, **1987**, *316*, 589.
- [11] Hershfield, M. S. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **1995**, *76*, S228.
- [12] Chapes, S. K.; Simske, S. J.; Sonnenfeld, G.; Miller, E. S.; Zimmerman, R. J. *J. Appl. Physiol.*, **1999**, *86*, 2065.
- [13] Tsuchiya, K.; Uchida, T.; Kobayashi, M.; Maeda, H.; Konno, T.; Yamanaka, H. *Urology*, **2000**, *55*, 495.
- [14] Maeda, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2001**, *46*, 169.
- [15] Talpaz, M.; O'Brien, S.; Rose, E.; Gupta, S.; Shan, J.; Cortes, J.; Giles, F. J.; Faderl, S.; Kantarjian, H. M. *Blood*, **2001**, *98*, 1708.
- [16] Crawford, J. *Pharmacotherapy*, **2003**, *23*, 15S.
- [17] Isidorinis, A.; Tani, M.; Bonifazi, F.; Zinzani, P.; Curti, A.; Motta, M. R.; Rizzi, S.; Giudice, V.; Farese, O.; Rovito, M.; Alinari, L.; Conte, R.; Baccarani, M.; Lemoli, R. M. *Haematologica*, **2005**, *90*, 225.
- [18] Yang, J. C.; Topalian, S. L.; Schwartzentruber, D. J.; Parkinson, D. R.; Marincola, F. M.; Weber, J. S.; Seipp, C. A.; White, D. E.; Rosenberg, S. A. *Cancer*, **1995**, *76*, 687.
- [19] Dillman, R. O.; Wiemann, M. C.; Bury, M. J.; Church, C.; DePriest, C. *Cancer Biother. Radiopharm.*, **1997**, *12*, 5.
- [20] Kaplan, B.; Moy, R. L. *Dermatol. Surg.*, **2000**, *26*, 1037.
- [21] Inoue, M.; Ebashi, I.; Watanabe, N.; Morino, Y. *Biochemistry*, **1989**, *28*, 6619.
- [22] Hovorka, O.; St'astny, M.; Etrych, T.; Subr, V.; Strohalm, J.; Ulbrich, K.; Rihova, B. *J. Control. Release*, **2002**, *80*, 101.
- [23] Hoare, T.; Pelton, R. *Langmuir*, **2004**, *20*, 2123.
- [24] Kaneda, Y.; Tsutsumi, Y.; Yoshioka, Y.; Kamada, H.; Yamamoto, Y.; Kodaira, H.; Tsunoda, S.; Okamoto, T.; Mukai, Y.; Shibata, H.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *Biomaterials*, **2004**, *25*, 3259.
- [25] Kamada, H.; Tsutsumi, Y.; Tsunoda, S.; Kihira, T.; Kaneda, Y.; Yamamoto, Y.; Nakagawa, S.; Horisawa, Y.; Mayumi, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1999**, *257*, 448.

- [26] Kamada, H.; Tsutsumi, Y.; Yamamoto, Y.; Kihira, T.; Kaneda, Y.; Mu, Y.; Kodaira, H.; Tsunoda, S. I.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 6416.
- [27] Tsunoda, S.; Kamada, H.; Yamamoto, Y.; Ishikawa, T.; Matsui, J.; Koizumi, K.; Kaneda, Y.; Tsutsumi, Y.; Ohsugi, Y.; Hirano, T.; Mayumi, T. *J. Control. Release*, **2000**, *68*, 335.
- [28] Tsutsumi, Y.; Tsunoda, S.; Kaneda, Y.; Kamada, H.; Kihira, T.; Nakagawa, S.; Yamamoto, Y.; Horisawa, Y.; Mayumi, T. *Jpn. J. Cancer Res.*, **1996**, *87*, 1078.
- [29] Tsutsumi, Y.; Tsunoda, S.; Kamada, H.; Kihira, T.; Kaneda, Y.; Ohsugi, Y.; Mayumi, T. *Thromb. Haemost.*, **1997**, *77*, 168.
- [30] Tsunoda, S.; Ishikawa, T.; Yamamoto, Y.; Kamada, H.; Koizumi, K.; Matsui, J.; Tsutsumi, Y.; Hirano, T.; Mayumi, T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, *290*, 368.
- [31] Tsunoda, S.; Ishikawa, T.; Watanabe, M.; Kamada, H.; Yamamoto, Y.; Tsutsumi, Y.; Hirano, T.; Mayumi, T. *Br. J. Haematol.*, **2001**, *112*, 181.
- [32] Yoshioka, Y.; Tsutsumi, Y.; Mukai, Y.; Shibata, H.; Okamoto, T.; Kaneda, Y.; Tsunoda, S.; Kamada, H.; Koizumi, K.; Yamamoto, Y.; Mu, Y.; Kodaira, H.; Sato-Kamada, K.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *J. Biomed. Mater. Res. A*, **2004**, *70*, 219.
- [33] Kodaira, H.; Tsutsumi, Y.; Yoshioka, Y.; Kamada, H.; Kaneda, Y.; Yamamoto, Y.; Tsunoda, S.; Okamoto, T.; Mukai, Y.; Shibata, H.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *Biomaterials*, **2004**, *25*, 4309.
- [34] Rypacek, F.; Drobnik, J.; Chmelar, V.; Kalal, J. *Pflugers Arch.*, **1982**, *392*, 211.
- [35] Kamada, H.; Tsutsumi, Y.; Sato-Kamada, K.; Yamamoto, Y.; Yoshioka, Y.; Okamoto, T.; Nakagawa, S.; Nagata, S.; Mayumi, T. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 399.
- [36] Ziyadeh, F. N.; Goldfarb, S. *Curr. Top. Pathol.*, **1995**, *88*, 175.
- [37] Jones, C. A.; McQuillan, G. M.; Kusek, J. W.; Eberhardt, M. S.; Herman, W. H.; Coresh, J.; Salive, M.; Jones, C. P.; Agodoa, L. Y. *Am. J. Kidney Dis.*, **1998**, *32*, 992.
- [38] Mihara, K.; Oka, Y.; Sawai, K.; Takakura, Y.; Hashida, M. *J. Drug Target.*, **1994**, *2*, 317.
- [39] Veronese, F. M.; Caliceti, P.; Schiavon, O.; Sergi, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2002**, *54*, 587.
- [40] Elfarra, A. A.; Duescher, R. J.; Hwang, I. Y.; Sicuri, A. R.; Nelson, J. A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1995**, *274*, 1298.
- [41] Haverdings, R. F.; Haas, M.; Greupink, A. R.; de Vries, P. A.; Moolenaar, F.; de Zeeuw, D.; Meijer, D. K. *Ren. Fail.*, **2001**, *23*, 397.
- [42] Schechter, B.; Arnon, R.; Colas, C.; Burakova, T.; Wilchek, M. *Kidney Int.*, **1995**, *47*, 1327.
- [43] Kok, R. J.; Grijpstra, F.; Walthuis, R. B.; Moolenaar, F.; de Zeeuw, D.; Meijer, D. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, *288*, 281.
- [44] Yamamoto, Y.; Tsutsumi, Y.; Yoshioka, Y.; Kamada, H.; Sato-Kamada, K.; Okamoto, T.; Mukai, Y.; Shibata, H.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *J. Control. Release*, **2004**, *95*, 229.
- [45] Bristow, M. R.; Billingham, M. E.; Mason, J. W.; Daniels, J. R. *Cancer Treat. Rep.*, **1978**, *62*, 873.
- [46] Praga, C.; Beretta, G.; Labianca, R. *Oncology*, **1980**, *37*(Suppl. 1), 51.
- [47] Wadler, S.; Fuks, J. Z.; Wiernik, P. H. *J. Clin. Pharmacol.*, **1986**, *26*, 491.
- [48] Sparano, J. A. *Semin. Oncol.*, **1999**, *26*, 14.
- [49] Matsumoto, S.; Yamamoto, A.; Takakura, Y.; Hashida, M.; Tani-gawa, N.; Sezaki, H. *Cancer Res.*, **1986**, *46*, 4463.
- [50] Yamamoto, H.; Miki, T.; Oda, T.; Hirano, T.; Sera, Y.; Akagi, M.; Maeda, H. *Eur. J. Cancer*, **1990**, *26*, 253.
- [51] Seymour, L. W.; Ulbrich, K.; Steyger, P. S.; Brereton, M.; Subr, V.; Strohalm, J.; Duncan, R. *Br. J. Cancer*, **1994**, *70*, 636.
- [52] Senter, P. D.; Svensson, H. P.; Schreiber, G. J.; Rodriguez, J. L.; Vrudhula, V. M. *Bioconjug. Chem.*, **1995**, *6*, 389.
- [53] Kabanov, A. V.; Okano, T. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2003**, *519*, 1.
- [54] Kopecek, J.; Kopeckova, P.; Minko, T.; Lu, Z. R.; Peterson, C. M. *J. Control. Release*, **2001**, *74*, 147.
- [55] Maeda, H.; Sawa, T.; Konno, T. *J. Control. Release*, **2001**, *74*, 47.
- [56] Fang, J.; Sawa, T.; Maeda, H. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2003**, *519*, 29.
- [57] Denny, W. A. *Anticancer. Drug Des.*, **1989**, *4*, 241.
- [58] Duncan, R.; Spreafico, F. *Clin. Pharmacokinet.*, **1994**, *27*, 290.
- [59] Wike-Hooley, J. L.; Haveman, J.; Reinhold, H. S. *Radiother. Oncol.*, **1984**, *2*, 343.
- [60] Wike-Hooley, J. L.; van den Berg, A. P.; van der Zee, J.; Reinhold, H. S. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, **1985**, *21*, 785.
- [61] Butler, P. J.; Harris, J. I.; Hartley, B. S.; Leberman, R. *Biochem. J.*, **1967**, *103*, 78P.
- [62] Butler, P. J.; Harris, J. I.; Hartley, B. S.; Leberman, R. *Biochem. J.*, **1969**, *112*, 679.
- [63] Kamada, H.; Tsutsumi, Y.; Yoshioka, Y.; Yamamoto, Y.; Kodaira, H.; Tsunoda, S.; Okamoto, T.; Mukai, Y.; Shibata, H.; Nakagawa, S.; Mayumi, T. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 2545.
- [64] Yamamoto, Y.; Tsutsumi, Y.; Yoshioka, Y.; Nishibata, T.; Kobayashi, K.; Okamoto, T.; Mukai, Y.; Shimizu, T.; Nakagawa, S.; Nagata, S.; Mayumi, T. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 546.
- [65] Shibata, H.; Yoshioka, Y.; Ikemizu, S.; Kobayashi, K.; Yamamoto, Y.; Mukai, Y.; Okamoto, T.; Taniai, M.; Kawamura, M.; Abe, Y.; Nakagawa, S.; Hayakawa, T.; Nagata, S.; Yamagata, Y.; Mayumi, T.; Kamada, H.; Tsutsumi, Y. *Clin. Cancer Res.*, **2004**, *10*, 8293.

創薬の立場からの DDS

プロテオーム創薬からの DDS 開発

鎌田 春彦* 堤 康 央*

要 旨

がんなどの難治性疾患を克服するため、より有効ながん治療法の開発が急務であり、全タンパク質の構造と機能解析をもとにした創薬プロテオーム解析に注目が集まっている。本総説では、このプロテオーム解析の結果から得られた情報をもとに、医薬価値に優れた薬物開発を行うための DDS 戦略を提示し、ファージ表面提示法を用いたタンパク質構造変異体の創出とその DDS 的有用性を紹介する。

プロテオミクスとがん治療

ヒトゲノム解析が終了し、ヒトの設計図となる遺伝子の配列が明らかになったが、それは細胞や組織、さらに臓器の機能の一部が明らかになったにすぎない。すなわち遺伝子は、マイクロ RNA など RNA として機能する一部を除き¹⁾²⁾、そのほとんどが転写・翻訳されたタンパク質によって機能すると考えられており、生体内の特定の細胞や組織で作られる全タンパク質の構造と機能を明らかにするプロテオーム解析に注目が集まっている。これらのタンパク質がネットワークを形成する機構を解明することにより、タンパク質の活性を阻害する薬物をデザインし、最終的に疾患の発症を抑制、あるいは症状を緩和する薬物の創出を行う、いわゆるプロテオーム創薬が

難治性疾患の克服に貢献するものと期待されている。

がんは複雑かつ多段階のステップを通じて発症する難治性の疾患であり、細胞内におけるタンパク質の挙動、特にリン酸化などの翻訳後修飾³⁾やタンパク質分解⁴⁾、代謝物⁵⁾の影響など、DNA チップなどを用いた大規模遺伝子発現解析法のみではがんの発症や悪性化を規定することはできないと考えられている。また、現在のがん治療は外科的な治療が主体となっており、非常に有効な治療法であるものの、転移がんのように外科的手術が不可能な症例も数多く存在し、より有効ながん治療法の開発が急務である。したがってより有効な医薬品開発を行うために、がんの初期あるいはそれぞれの悪性度によってタンパク質の特定の機能のみをピンポイントに阻害しうる新しい DDS の開発が必要になるものと考えられており、プロテオミクスなどの新しい大規模解析法が新規分子標的治療の開発に有効な手段であることが示唆されている⁶⁾。

* 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト

キーワード：プロテオーム創薬, DDS, ファージ表面提示法, バイオコンジュゲーション, TNF

このような観点のもと、病態発現メカニズムの解析に役立つ情報を集積するため、患者由来のさまざまな試料を用いたプロテオーム解析が幾つか報告され、がんなどの疾患の診断に有効なバイオマーカーに関して幾つかの報告が出始めている。特に surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight (SELDI-TOF) 質量分析装置を用いた卵巣がんの診断においては、非常に有効な診断結果が得られている⁷⁾。また、2次元泳動ゲルをベースにしたがん組織バイオプシーの検討では、膀胱がん⁸⁾や肺がん⁹⁾をはじめとするさまざまながんに対して、その進行度による分子マーカーの違いなどが明らかになりつつある¹⁰⁻¹²⁾。これらバイオマーカーの探索が進む一方で、膜タンパク質を標的としてプロテオーム解析し、肺がんの特異的な発現タンパク質を探索した例においては、腫瘍の細胞膜上に特異的に発現する幾つかの分子が同定され、それに対する抗体を投与することで腫瘍特異的に集積することが確認されている。Ohらの報告によると¹³⁾、細胞膜分画のプロテオーム解析を通じて腫瘍血管に多く発現することが明らかとなったアミノペプチダーゼやアネキシンを標的とした抗体治療が、有効性の高いがん治療として明らかになっている。現在、疾患プロテオーム解析はまだ緒に就いたばかりであり、いまだ暗中模索の状態ではあるものの、このようなさまざまな有効な治療標的の探索に成功したものもあり、プロテオミクス技術を活用した解析研究が医薬品シーズ・創薬ターゲットとなるタンパク質の探索に結びつくものと期待されている。

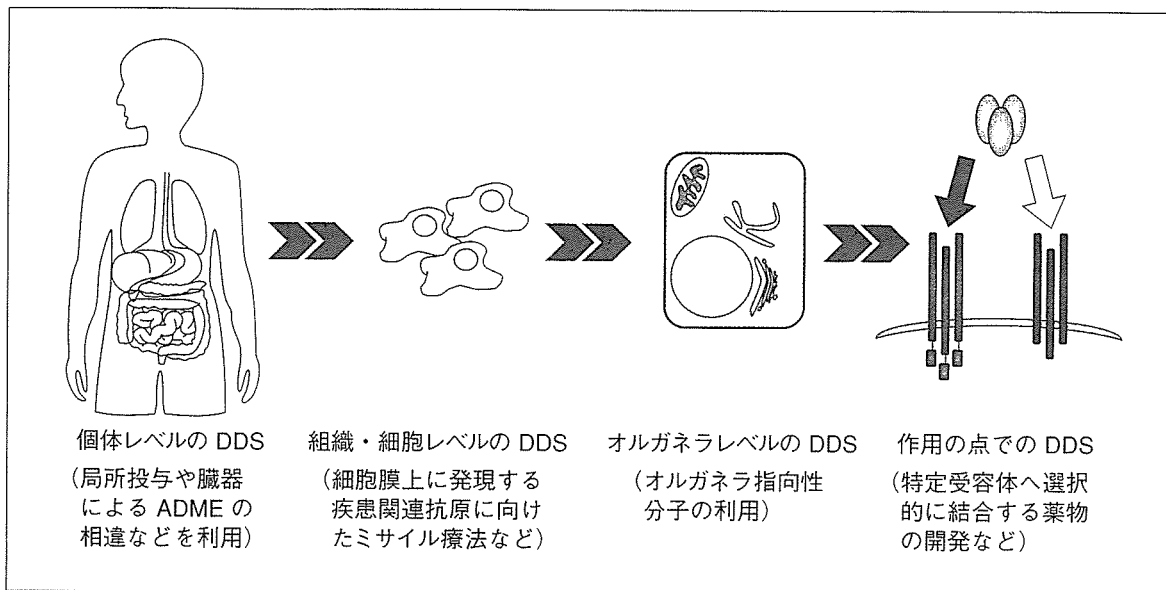
機能性タンパク質を応用した DDS の試み

しかし、疾患プロテオーム解析の結果から

発見された医薬品シーズ・創薬ターゲットに対する薬物治療戦略として、単純にその標的タンパク質に結合する薬物の作製のみでは治療効果は上がらないものと考えられる。特にリガンド-受容体の結合により細胞を刺激するサイトカインのようなタンパク質では、一般に体内安定性に乏しく、その治療効果を示すために大量頻回投与を余儀なくされており、臨床応用が極めて制限されている。さらに、サイトカインは1対1の相互作用を示すのではなく、複数の受容体やリガンドがお互いに分子間相互作用しながら高度にその機能が制御されており、この点においても臨床応用に利用可能なサイトカインは限局されているのが現状である。したがって、切れ味鋭い作用を示すことが期待されるサイトカインを利用した薬物治療を行うに当たって、既存のDDSを踏まえたうえで、図1に示すようなより高度なDDS技術の進歩が必要不可欠であると考えられる。すなわち、臓器や組織レベルの標的指向性(ターゲティング能)を付与するだけでなく、細胞、さらに細胞内に含まれる各種オルガネラや作用の点でのターゲティング能を付与する必要がある。

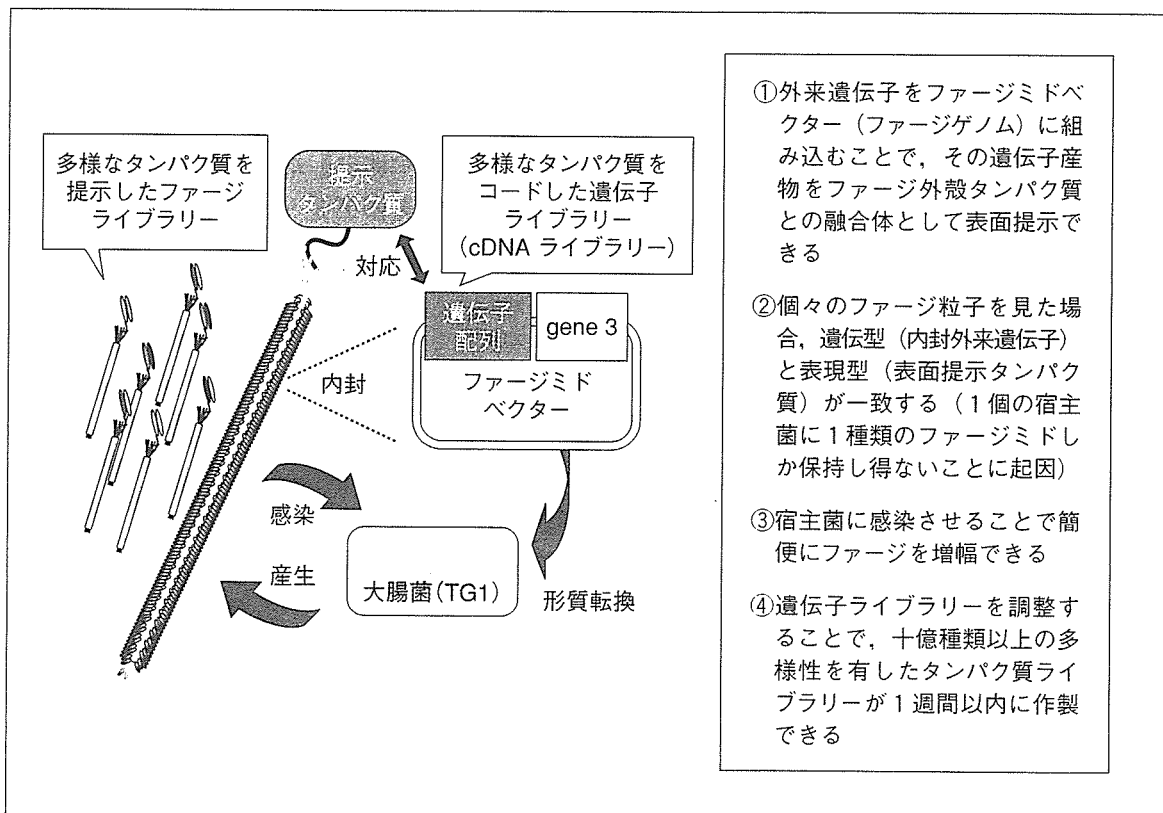
このような現状を踏まえて、我々は受容体に結合するリガンドとなる構造変異タンパク質を作製し、プロテオーム創薬を指向した新しいDDSの開発を行うことで、医薬価値に優れたタンパク質性医薬品の開発を進めている。構造変異タンパク質を作製するためのツールとして、我々は図2に示すファージ表面提示法を応用している¹⁴⁾¹⁵⁾。ファージ表面提示法は、ファージ表面上に提示させた膨大な多様性を有するペプチド・タンパク質ライブラリーの中から、特定ターゲットに親和性を持つペプチド・タンパク質を結合能力に基づいて探索する方法として利用されている¹⁶⁾¹⁷⁾。ファージ表面提示法の利点は、大腸菌とファージミドベクターを利用することで簡便に

図1 DDSの変遷



ADME：薬物動態 (absorption, distribution, metabolism, excretion)

図2 ファージ表面提示法の概要



ファージが増幅できるため、ペプチド・タンパク質ライブラリーの構築からスクリーニングに至る過程をわずか2週間という短期間で

行える点にある。我々はこのファージ表面提示法を応用し、タンパク質の構造変異体ライブラリーを作製することで、網羅的な機能性

構造変異タンパク質の作製を通じて分子間相互作用を自由に制御できる機能性タンパク質構造変異体の創出を行った。この方法論は、膨大な構造変異体ライブラリーの中から目的とする薬物を選択する方法論であるが、我々の戦略は構造変異タンパク質ライブラリーの中から医薬価値に優れた機能性人工タンパク質を迅速創出しようとするものであり、分子進化戦略とも言うべき、他に類を見ないものである。

この構造変異体ライブラリーの作製において、我々は抗がん活性を持つサイトカインとして臨床応用が期待された TNF を標的に定めた。TNF は腫瘍を特異的に傷害するサイトカインとして見いだされ、夢の抗がん剤として一躍脚光を浴びた¹⁸⁾。しかしながら TNF は体内安定性に極めて乏しいため、その臨床応用の際には大量頻回投与を余儀なくされ、その結果、発熱や血圧低下、エンドトキシン様ショックといった重篤な副作用を招いてしまうことが明らかとなってきた¹⁹⁾。例えば、TNF を全身性の抗がん剤として用いようとした場合、副作用を回避するためにはその投与量を抗腫瘍作用の発現に必要な量のわずか 1/5~1/25 に制限せざるを得ない。以上の理由から、その切れ味鋭い抗腫瘍活性にまだまだ大きな期待が込められつつも、TNF の医薬品化はほとんど断念されようとしているのが現状である。この点我々は、タンパク質の体内安定性を向上させ、目的治療作用の選択的発現能を付与できる高分子バイオコンジュゲート化 DDS を開発しようと試みてきた。タンパク質に水溶性高分子を結合させる高分子バイオコンジュゲート化 DDS は、タンパク質の生体内安定性を向上できる最適の方法と世界的に位置づけられているものの¹⁴⁾²⁰⁾、その成功例は残念ながら少ない。この最大の原因は、タンパク質の活性中心に存在するリシン残基へのランダムな高分子導入によって

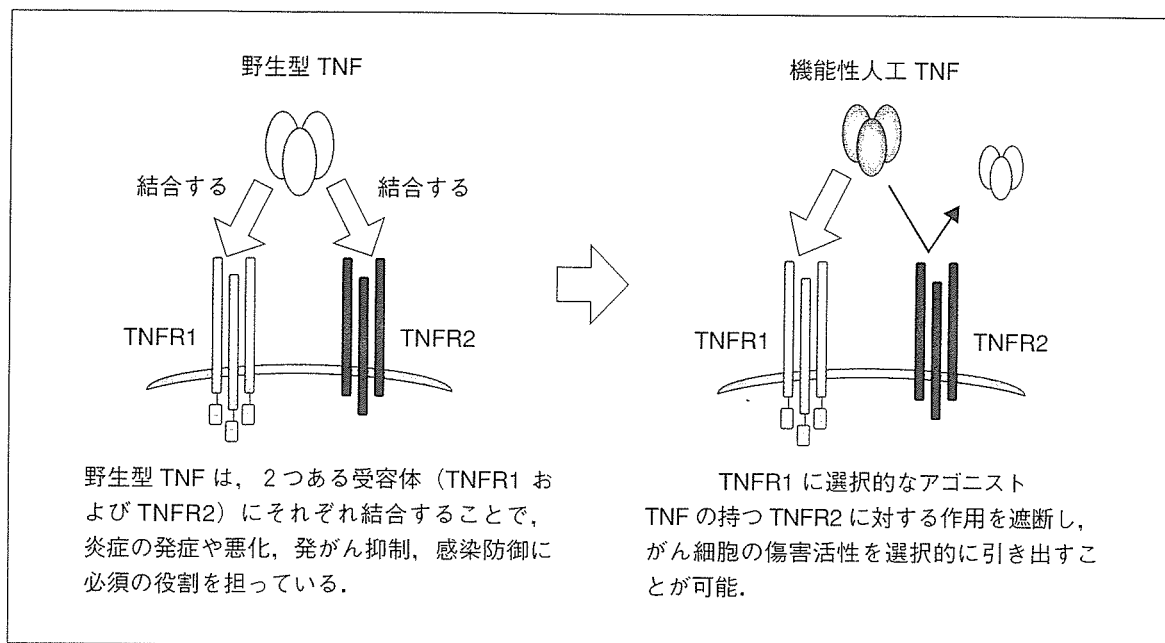
生じてしまう致命的な比活性低下にある。

そこで我々は、部位特異的なバイオコンジュゲーション法を活用するために、まず TNF 分子内に存在するすべてのリシン残基を欠損した TNF を作製した¹⁹⁾。TNF は、従来までの点突然変異解析や立体構造解析から、リシンが立体構造形成や受容体結合に重要な役割を担っている²¹⁻²³⁾ ため、野生型 TNF と同等の活性を保持したリシン欠損体は理論上作製できないと考えられていた。しかし我々はこの既成概念を覆す知見、すなわち TNF 中の全リシン残基(6個)を一挙に他のアミノ酸へ置換することで逆に野生型 TNF の5倍以上もの生物活性を有するリシン欠損 TNF を創出することに成功している²⁴⁾。TNF の N 末端は TNF の持つ生物活性とは無関係であることが知られており、この機能性リシン欠損タンパク質をバイオコンジュゲーション法と組み合わせることで、比活性の低下がほとんどないバイオコンジュゲート化 TNF 変異体の作製に成功した。この N 末端特異的なバイオコンジュゲート化 TNF リシン欠損体は、従来のバイオコンジュゲーションを施したものと比較し、*in vitro* の活性で約 50 倍も優れていた。したがって、この「N 末端アミノ基のみを標的とした部位特異的高分子バイオコンジュゲート化 DDS 法」は、従来法の諸問題を一挙に克服する非常に有効な DDS であることが明らかになった。

TNFR1 指向性アゴニストを用いた がんのターゲティング療法

一方で、TNF は 2 種類の受容体 (TNFR1 および TNFR2) を介して作用発現しているが、このうち TNFR1 は TNF の抗腫瘍メカニズムの活性化に、TNFR2 は TNF の副作用発現に関与しているものと推定されている²⁵⁾。興味深いことに、マウス TNFR2 に結合しないヒト TNF は、マウス固形がんに対

図3 医薬価値に優れた機能性人工 TNF の創出



してマウス TNF と同程度の抗腫瘍効果を発揮するのに対し、その致死毒性はマウス TNF の 1/50 以下であることが知られている²⁶⁾。また、TNFR1 および TNFR2 のノックアウトマウスの検討から、腫瘍血管内皮細胞に対する傷害活性や血管透過性の亢進が TNFR1 を介して発現することが予想されている²⁷⁾²⁸⁾。TNFR2 には結合せず、TNFR1 へのみ選択的に結合して作用発現できる TNF 変異体 (TNF のアミノ酸置換体)、TNFR1 指向性 TNF アゴニストは、これまでその圧倒的な抗腫瘍効果にもかかわらず、強い副作用ゆえに臨床応用が制限されてきた TNF の臨床応用への道を開くものと期待される。

以上の観点から我々は、先述した我々が独自に確立してきたファージ表面提示法を駆使して、TNFR1 を介した生物活性が野生型 TNF よりも優れ、かつ TNFR2 とは結合しない TNF 変異体 (TNFR1 指向性アゴニスト) を創出し、受容体への選択的な結合性 (標的指向性) を有する「高度な DDS 機能を持った新たな抗腫瘍サイトカイン」の分子設計戦略を考えた (図3)。我々は、タンパク質の立

体構造解析の結果から明らかになっている各受容体への結合に重要とされるアミノ酸配列を網羅的に改変した構造変異 TNF を発現するファージライブラリーを作製し、単一の受容体へのみ選択的に結合する構造変異 TNF を探索した。約 6 千万種類の構造変異 TNF を内包した TNF 変異体ライブラリーよりスクリーニングした結果、TNFR1 および TNFR2 それぞれに特異的に結合するクローンを多数得ることができた (現在投稿中)。TNFR1 へのみ選択的に結合するクローン群では、TNFR1 への結合性が最大で約 80% も向上しているにもかかわらず、TNFR2 への結合性は野生型の 0.05% 以下にまで低下していた。現在、この TNF 構造変異体の生物活性に関して検討しており、今後この変異体のアゴニストあるいはアンタゴニストとしての特性が明らかになるものと期待している。

結 語

ヒトゲノム解読の結果から、ヒト遺伝子が約 2 万程度という予想をはるかに下回る数でしか構成されていない事実が明らかとなり、

遺伝子の数でのみ高等な機能が発揮されていないことがほぼ証明された。すなわち、ヒトのような高等とされる生物においても、限られた遺伝子を最大限に利用するシステムが生命現象の中に内包されており、1つの遺伝子が効率的に機能していることが明らかとなったわけである。この遺伝子の機能は、RNAとして機能している一部の遺伝子を除けば、ほとんどの場合タンパク質という形をとって具現されている。すなわち、高等な生命活動を調整するのは遺伝子の数を頼むのではなく、遺伝子から翻訳されたタンパク質が数多くのタンパク質との相互作用を経て、極めて効率的に機能することで発揮されるものと考えられている。ゲノム解析の結果から、実在すると考えられている機能未知のタンパク質は総遺伝子数の約半分であるとされるが、機能が既知とされるタンパク質もこのような分子間相互作用に着目した機能性アゴニストやアンタゴニストの開発により、全く未知の機能が明らかになってくるものと期待される。このような機能が既知あるいは未知にかかわらず、タンパク質の機能がより詳細に解析されることにより、生命の生業にとどまらず数多くの疾患の原因分子が明らかにされ、ポストゲノムシーケンス研究としてこの創薬を最終目的とした場合、今後の疾患プロテオーム解析情報を有効活用した画期的創薬に貢献するものと期待される。本総説で示した複数の受容体への結合性を目的とする受容体のみ結合させるタンパク質構造変異体作製技術は、「分子レベルの DDS」を達成するうえで必要不可欠なものであると考えられる。さらに、このような「分子レベルの DDS」をタンパク質性医薬品の開発に応用することで、いまだ有効な治療法の存在しないがんに対する治療薬が開発できるものと期待している。

文 献

- 1) Kim VN: MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (5): 376-385, 2005.
- 2) Croce CM, et al: miRNAs, cancer, and stem cell division. *Cell* 122 (1): 6-7, 2005.
- 3) Bjornsti M A, et al: Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell* 5 (6): 519-523, 2004.
- 4) Fehrenbacher N, et al: Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* 65 (8): 2993-2995, 2005.
- 5) Fuster MM, et al: The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 5 (7): 526-542, 2005.
- 6) Celis JE, et al: Proteomics in translational cancer research: toward an integrated approach. *Cancer Cell* 3 (1): 9-15, 2003.
- 7) Petricoin EF, et al: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 359 (9306): 572-577, 2002.
- 8) Celis JE, et al: Loss of adipocyte-type fatty acid binding protein and other protein biomarkers is associated with progression of human bladder transitional cell carcinomas. *Cancer Res* 56 (20): 4782-4790, 1996.
- 9) Oh JM, et al: A database of protein expression in lung cancer. *Proteomics* 1 (10): 1303-1319, 2001.
- 10) Wulfkuhle JD, et al: New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 1 (10): 1205-1215, 2001.
- 11) Lawrie LC, et al: Application of laser capture microdissection and proteomics in colon cancer. *Mol Pathol* 54 (4): 253-258, 2001.
- 12) Melhem R, et al: Quantitative analysis of Op18 phosphorylation in childhood acute leukemia. *Leukemia* 11 (10): 1690-1695, 1997.
- 13) Oh P, et al: Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 429 (6992): 629-635, 2004.
- 14) Mukai Y, et al: Phage display and PEGylation of therapeutic proteins.

- Comb Chem High Throughput Screen 8 (2): 145-152, 2005.
- 15) Yamamoto Y, et al: Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF- α with full bioactivity. *Nat Biotechnol* 21 (5): 546-552, 2003.
 - 16) Ladner RC, et al: Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today* 9 (12): 525-529, 2004.
 - 17) Kretzschmar T, et al: Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13 (6): 598-602, 2002.
 - 18) Haranaka K, et al: Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int J Cancer* 34 (2): 263-267, 1984.
 - 19) Whitehead RP, et al: A phase II trial of recombinant tumor necrosis factor in patients with metastatic colorectal adenocarcinoma: a Southwest Oncology Group study. *J Biol Response Mod* 9 (6): 588-591, 1990.
 - 20) Frokjaer S, et al: Protein drug stability: a formulation challenge. *Nat Rev Drug Discov* 4 (4): 298-306, 2005.
 - 21) Van Ostade X, et al: Localization of the active site of human tumour necrosis factor (hTNF) by mutational analysis. *EMBO J* 10 (4): 827-836, 1991.
 - 22) Yamagishi J, et al: Mutational analysis of structure-activity relationships in human tumor necrosis factor- α . *Protein Eng* 3 (8): 713-719, 1990.
 - 23) Eck MJ, et al: The structure of tumor necrosis factor- α at 2.6 Å resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem* 264 (29): 17595-17605, 1989.
 - 24) Shibata H, et al: Functionalization of tumor necrosis factor- α using phage display technique and PEGylation improves its antitumor therapeutic window. *Clin Cancer Res* 10 (24): 8293-8300, 2004.
 - 25) Barbara JA, et al: Tumour necrosis factor- α (TNF- α): the good, the bad and potentially very effective. *Immunol Cell Biol* 74 (5): 434-443, 1996.
 - 26) Brouckaert P, et al: Selective species specificity of tumor necrosis factor for toxicity in the mouse. *Lymphokine Cytokine Res* 11 (4): 193-196, 1992.
 - 27) Lucas R, et al: Both TNF receptors are required for direct TNF-mediated cytotoxicity in microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 28 (11): 3577-3586, 1998.
 - 28) Jensen JM, et al: Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest* 104 (12): 1761-1770, 1999.

DDS from The Viewpoint of Drug Discovery: Proteomic Approaches for Development of DDS

Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi

Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation

薬物動態制御によるナノ治療

吉川友章¹ 堤 康央^{1,2} 中川晋作¹

Development of nanomedicine using intracellular DDS

¹Tomoaki Yoshikawa, ^{1,2}Yasuo Tsutsumi, ¹Shinsaku Nakagawa

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

²National Institute of Biomedical Innovation

Abstract

In recent years, sustained release and targeting system using nanospheres or microspheres is noticed in systemic pharmacokinetics. However, in the near future, not only “systemic pharmacokinetics” but also “intracellular pharmacokinetics” seems to be important in Drug Delivery System research. In this context, we have tried to develop the novel cytoplasmic nanoparticle (NP) delivery methods using fusogenic liposomes (FL) and protein transduction domain (PTD). In this study, we demonstrated that the FL efficiently delivered the encapsulated NP to the cytoplasm directly in a fusion-dependent. Oligonucleotides attached to NP were gradually released in the cytoplasm after its efficient delivery using FL. Furthermore, we have succeeded in identifying the novel PTD using phage displayed random peptide library. In near future, this novel PTDs are applied to cytoplasmic NP delivery carrier. From these results, we suggested that this technology is very important to control the intracellular pharmacokinetics, and can be also applied to any NP which will be produced by the nanotechnology in the future.

Key words: Drug Delivery System, nanotechnology, fusogenic liposome, protein transduction domain (PTD), phage display system

はじめに

ポストゲノム研究の中心的役割を担っているプロテオームやメタボローム研究, 更には細胞機能の網羅的解析の進展に伴い, 疾病治療の標的となり得る細胞内分子が続々と同定されることが予測される。したがって, ポストゲノム時代の薬物治療研究においては, これら細胞内分子を標的とした治療薬の開発が急務となること

が予想され, 特にペプチドや蛋白質あるいは遺伝子などの生体内高分子を薬物としてとらえ, それらを細胞内に導入して治療しようとするアプローチがますます脚光を浴びるようになるであろう。しかし, これら生体内高分子は従来までの低分子有機化合物などの薬物とは異なり, 生体膜透過性が極端に悪く, 細胞質内の特定のオルガネラに送達しないかぎり治療効果を得ることができない。すなわち, 細胞内にある疾患

¹大阪大学大学院薬学研究科 ²独立行政法人医薬基盤研究所

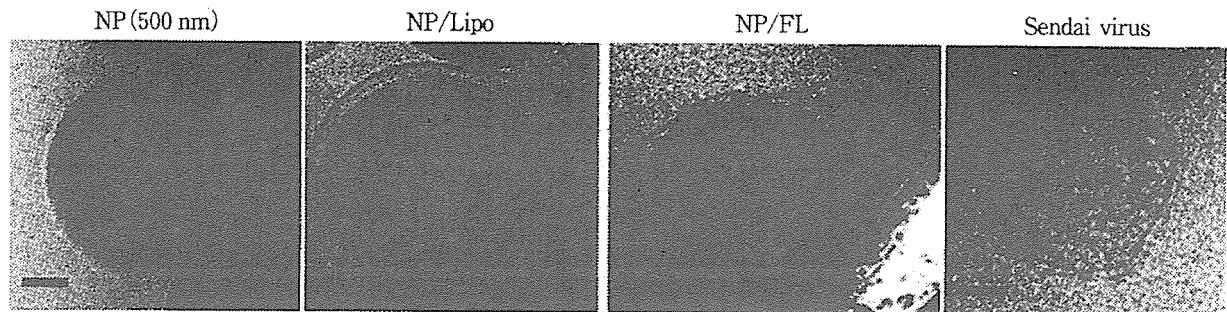


図1 Characterization of NP-Lipo and NP-FL

NP-FL were observed by Cryo-TEM. Bar is identical to 100 nm.

原因因子(遺伝子や蛋白質)を標的として、副作用を示すことなく最大の薬理効果を発揮させるためには、薬物としての核酸やペプチドなどを効率良く細胞内に導入する技術に加えて、細胞内においてそれら薬物濃度を維持するための徐放化や、標的オルガネラへのターゲットティングなど、細胞内での薬物の動態を時空間的に制御する新しい Drug Delivery System (DDS) 技術の開発が必要となる。

そこで本稿では、著者が試みている細胞内 DDS の確立に向けた研究の中でも、ナノ粒子を応用した細胞内 DDS の開発に焦点を絞り、その成果を紹介したい。

生体レベルでは、マイクロメートルオーダーの薬物固定化微粒子を用いて薬物徐放による体内薬物濃度の維持や標的指向化など、薬物の体内動態を制御しようと試みられており、一部では良好な成果が得られている。しかし、これを細胞内というナノ空間において行おうと考えた場合、‘薬物担体の微小化(ナノオーダー化)’と‘微粒子の細胞内導入法の開発’が必須である。前者については、ナノテクノロジーの発展により、今後様々な優れた機能性ナノ粒子が開発されてくるであろう。しかしながら、これら機能性ナノ粒子は、ほとんどの場合、エンドサイトを介して細胞内へ取り込まれるため、細胞内ではエンドソーム膜に包まれた状態で存在する。すなわち微粒子を用いて細胞内における薬物動態を制御するためには、まず第一に微粒子を細胞質内に導入するデリバリーシステムの開発が必要不可欠である。このような背景の下

著者らは、細胞内という‘ナノ空間’における薬物動態制御の開発を目的に、膜融合リポソーム (FL) や細胞内移行ペプチド (PTD) を応用した機能性ナノ粒子の細胞質内導入技術の開発を試みている。

1. 膜融合リポソーム (FL) を用いた細胞質内ナノ粒子デリバリー技術の確立

膜融合リポソーム (FL) は、リポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与したバイオ・ナノ・キャリアである。既に著者らは、細胞膜との融合により、FL 内に封入した遺伝子¹⁻³⁾ や機能性核酸⁴⁾、蛋白質⁵⁻⁸⁾、ペプチド⁹⁾ などの高分子を細胞質内に直接導入できることを明らかにしている。したがって、高分子と同様、FL 内にナノ粒子を封入することができれば、膜融合を介してナノ粒子をも細胞質内へ直接導入できると考えた。

a. ナノ粒子封入膜融合リポソームの作製と細胞内粒子導入 (図 1)¹⁰⁾

まず、モデルナノ粒子として緑色蛍光を発する直径 500 nm のナノ粒子 (molecular probe) を封入した FL を作製し、細胞質内への粒子導入について検討した。凍結乾燥空リポソーム法を用いて粒子径 500 nm のナノ粒子を封入したリポソームを作製し、そのリポソームを用いて FL を作製した。作製したナノ粒子封入 FL (FL/NP) を透過型電子顕微鏡で観察したところ、リポソームおよび FL の内水相にナノ粒子が封入されており、更に FL の表面には、センダイウイルスと同様に細胞膜との融合にかかわるスパイク

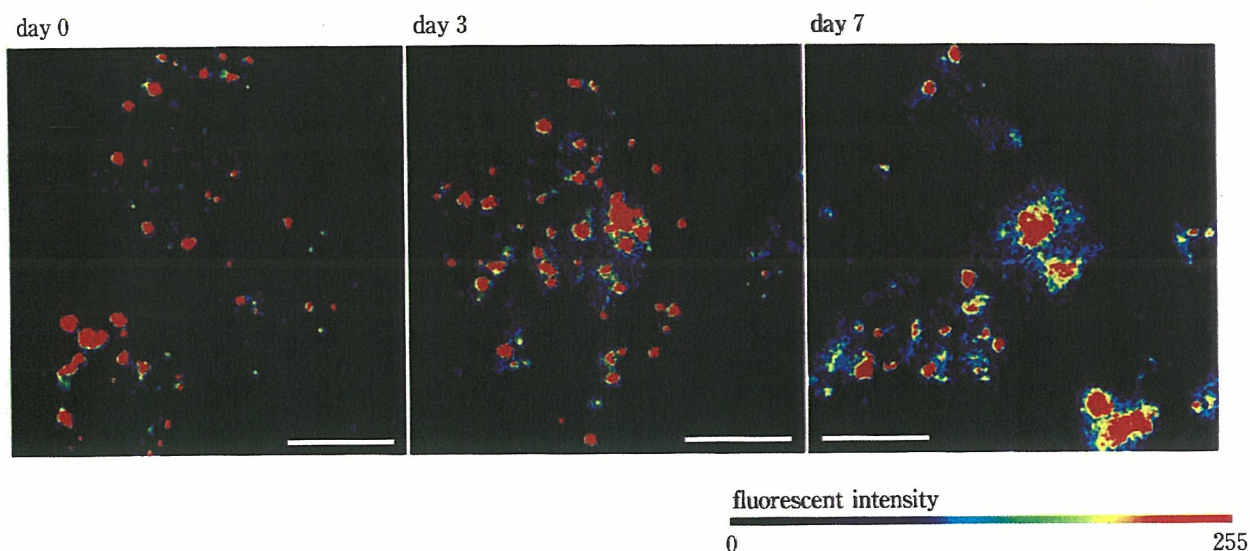


図2 Sustained release of oligonucleotides from NP introduced by FL

LLCMK2 cells were cultured with FL containing oligonucleotide-adsorbed NP for 30 min. Intracellular distribution of oligonucleotides were visualized by confocal microscopy on day 0, day 3, and day 7. Relative fluorescence intensities were represented by a 256-color spectrum. Bars indicate 20 μ m.

状の膜蛋白が存在していることが確認された¹⁰⁾. このFL/NPによる細胞内へのナノ粒子導入活性をFACS法により検討した結果, 作用させた細胞の90%以上にナノ粒子の導入が認められた. 更に蛍光強度から細胞内に導入されたナノ粒子数を算定したところ, 1細胞当たり平均約10個, 更に26個以上導入されている細胞群も約5%以上存在した. 一方, ナノ粒子単独やナノ粒子を封入した通常のリポソーム(NP/Lipo)を作用させた細胞においては, ナノ粒子の取り込みはほとんど確認されなかった. 以上の結果より, FLは内封したナノ粒子を細胞内に効率よく導入できることが示された.

b. FLを用いた細胞内薬物徐放化システムの開発

次に薬物固定化ナノ粒子をFLを用いて細胞内に導入し, 細胞内における薬物徐放について検討した. モデル薬物として蛍光標識したオリゴヌクレオチド(ODN)を粒子表面がカチオン性のポリビニルアミンナノ粒子に吸着させ, FLを用いて細胞質内に導入した. 細胞質内でのオリゴヌクレオチドの局在を共焦点レーザー顕微鏡にて評価した結果, 細胞質内に導入されたナノ粒子から経日的にオリゴヌクレオチドが

細胞質内へ徐々に放出されている蛍光像が観察された(図2). 以上の結果より, FLを用いて薬物徐放性ナノ粒子を細胞質内に直接導入することで, 細胞内において薬物を徐放させることが可能であることが示唆された. 今後ナノテクノロジーの発展に伴って, 温度・熱などの刺激, あるいは細胞内環境変化に応答するような, 機能性ナノ粒子が続々と開発されることが予測される. FLによるナノ粒子の細胞質内直接導入法はこれら新規ナノ粒子にも適用可能な汎用性の高い方法論であり, 各種ナノ粒子と組み合わせることでより有効性の高い薬物治療が達成できるものと期待される.

2. 細胞内DDSの実現にかなう新規ペプチド性キャリアの探索

近年, HIV由来のTATペプチドといったprotein transduction domain(PTD)が細胞膜を透過する活性を有することが明らかとなり, 新規の細胞内物質導入キャリアとして注目されている. PTDの細胞内侵入機構の詳細は明らかではないが, 細胞内に取り込まれた後に細胞質内へと移行することが報告され^{11,12)}, PTDをリポソームや磁性ナノ粒子に結合させることで, 粒

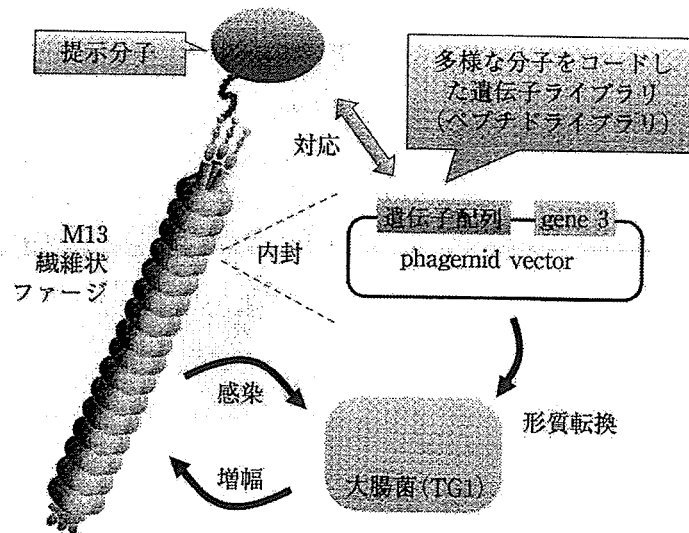


図3 Phage displayed random peptide library

子状の物質をも細胞内へ導入可能であることが報告されている^{13,14)}。これらの報告を踏まえると、PTDはFLと同様に様々な機能性ナノ粒子を細胞質内へ導入するにあたり、優れたツールになる可能性が高い。しかし、PTDを用いた微粒子導入の成功例はごくわずかであり、また細胞特異性や細胞内移行活性において十分とはいきれないのが現状である。そのため、優れたPTDの開発を目指して、現在世界的にPTDの立体構造解析に基づいたアナログ作製や細胞への吸着性向上を目的としたカチオン性アミノ酸導入体の作製が、ペプチド合成法によりトライ・アンド・エラーで進められている。しかしながら、これらの方法は膨大な時間、労力を費やすばかりか、作製可能なペプチドの多様性(種類)にも限界があるなど、期待通りのPTDはほとんど得られていない。

以上の背景から著者らは、ファージ表面提示法を駆逐することで、その細胞親和性・特異性や細胞内移行性といった機能をハイスループット解析できるテクノロジーの開発を試みている。

a. ランダムペプチド提示ファージライブラリの構築

近年、ファージ表面提示法は、ターゲット(分子・粒子・細胞)に親和性を有する蛋白質やペプチドを網羅的かつ迅速に探索し得る技術として広く用いられるようになってきた¹⁵⁻¹⁹⁾。こ

のファージ表面提示法の特徴は、①ファージ外殻蛋白質遺伝子の5'末端領域に、任意の外来遺伝子を組み込んだファージミドベクターを構築することにより、その外来遺伝子産物をターゲットと相互作用可能な状態でファージ表面に提示できること、②個々のファージ粒子は、遺伝型(ファージ粒子に内封されている外来遺伝子)と表現型(ファージ表面に提示された蛋白質)が一致していること(1個の宿主菌に1個のファージしか感染しないことによる)、③多様な外来遺伝子産物を表面提示したファージを数十億種類以上のレパートリーを有するライブラリとして容易に調製できること、④宿主菌に感染させることで簡便にファージを増幅することにある。そのため、ランダムペプチドやナイーブ抗体などをファージ表面に提示させたファージライブラリを短期間(約1週間)で構築できる。更に、これらのライブラリの中から、ターゲット分子と親和性を有するファージを回収し、増幅するという一連の操作(パンニング)を繰り返すことにより、標的分子に対して高親和性の分子を表面提示したファージのみを濃縮・選択できる。しかも得られたファージは提示している分子をコードする遺伝子を内封しているため、当該分子の遺伝子配列情報をも同時に得ることができるという利点を有している(図3)。そこで著者らは、新規PTDの創製を目的に、

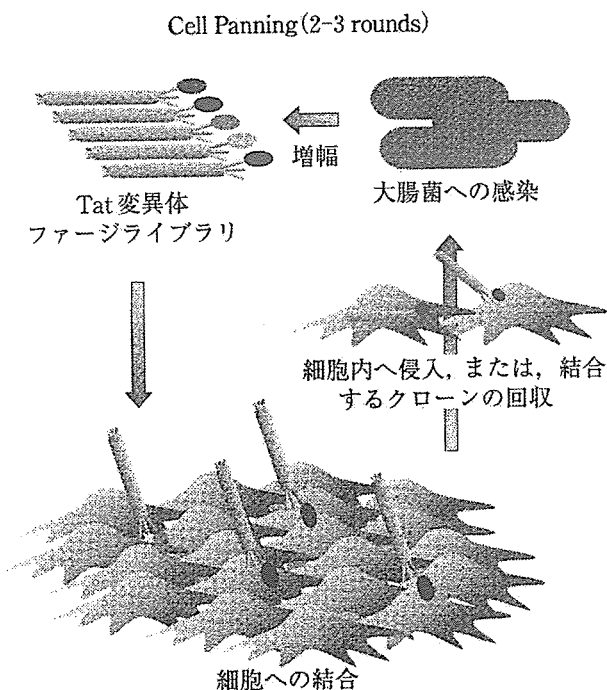


図4 Schematic diagram of the cell panning

まず18アミノ酸のランダムペプチドを提示したファージライブラリ(18a.a.-ファージライブラリ)を作製し、特定細胞に結合、あるいは細胞内へ侵入する活性を有するペプチドのスクリーニングを試みた。

b. 細胞パニングによるスクリーニング (図4)

細胞内移行活性に優れたPTDを創製するために、18個のアミノ酸をランダムに並べたランダム18a.a.ペプチドライブラリを用い、モデル標的細胞(A431細胞)に対するパニングを行った。パニングを繰り返すにしたがって、A431細胞に結合するペプチド提示ファージが

濃縮されていることを確認した。濃縮されたライブラリの中から更に細胞内移行活性を有するクローンだけを選び出し、その遺伝子配列を解析した結果、これまでに報告されているPTD活性を有するペプチドとは全く異なるペプチドが提示されている数種類のクローンの存在を明らかにした。PTDは一般にアルギニンなどの塩基性アミノ酸に富んだペプチド^{11,12)}であるが、今回濃縮されたペプチドのなかにはプロリンを多く含むペプチドが複数クローン存在していた。現在、その各クローンのペプチドの細胞内移行活性を評価しているが、少なくともTATペプチドよりも優れた細胞内移行活性を有するペプチドを得ることに成功している。

今回得られた新規PTDの細胞内移行機序や細胞特異性などを、既存のPTDと比較検討することで、細胞質内微粒子送達や、薬物送達の最適化にかなうPTDの分子設計指針において重要な知見が得られるものと考えており、この点については、別な機会に報告させて頂きたい。

おわりに

以上、本稿では細胞内DDSの確立を目指した細胞質内ナノ粒子デリバリー法の開発について紹介した。FLやPTDを用いたナノ粒子の細胞質内デリバリー法は、今後続々と開発されてくることが予想される様々な機能性ナノマテリアルに適用可能な汎用性の高い方法論である。そして細胞質内ナノ粒子デリバリーに基づく細胞内DDSは、次世代の細胞内ナノ治療を展開していくうえで多大な貢献をもたらすものと期待される。

■ 文 献

- 1) Mizuguchi H, et al: Efficient gene transfer into mammalian cells using fusogenic liposome. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 402-407, 1996.
- 2) Mizuguchi H, et al: Tumor necrosis factor alpha-mediated tumor regression by the in vivo transfer of genes into the artery that leads to tumors. *Cancer Res* 58: 5725-5730, 1998.
- 3) Yoshikawa T, et al: Augmentation of antigen-specific immune responses using DNA-fusogenic liposome vaccine. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 500-505, 2004.
- 4) Kondoh M, et al: Growth inhibition of human leukemia HL-60 cells by an antisense phosphodiester oligonucleotide encapsulated into fusogenic liposomes. *Biol Pharm Bull* 23: 1011-1013, 2000.
- 5) Kunisawa J, et al: Pharmacotherapy by intracellular delivery of drugs using fusogenic liposomes:

- application to vaccine development. *Adv Drug Deliv Rev* **52**: 177-186, 2001.
- 6) Kunisawa J, et al: Sendai virus fusion protein mediates simultaneous induction of MHC class I/II-dependent mucosal and systemic immune responses via the nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue immune system. *J Immunol* **167**: 1406-1412, 2001.
 - 7) Mizuguchi H, et al: Application of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin to cancer therapy. *Br J Cancer* **73**: 472-476, 1996.
 - 8) Mizuguchi H, et al: Intratumor administration of fusogenic liposomes containing fragment A of diphtheria toxin suppresses tumor growth. *Cancer Lett* **100**: 63-69, 1996.
 - 9) Sugita T, et al: Fusogenic liposome can be used as an effective vaccine carrier for peptide vaccination to induce cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. *Biol Pharm Bull* **28**: 192-193, 2005.
 - 10) Kunisawa J, et al: Fusogenic liposome delivers encapsulated nanoparticles for cytosolic controlled gene release. *J Control Release* **105**: 344-353, 2005.
 - 11) Richard JP, et al: Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* **278**: 585-590, 2003.
 - 12) Caron NJ, et al: Endosome disruption enhances the functional nuclear delivery of Tat-fusion proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **319**: 12-20, 2004.
 - 13) Lewin M, et al: Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* **18**: 410-414, 2000.
 - 14) Torchilin VP, et al: TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8786-8791, 2001.
 - 15) Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315-1317, 1985.
 - 16) Pasqualini R, Ruoslahti E: Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* **380**: 364-366, 1996.
 - 17) Yamamoto Y, et al: Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. *Nat Biotechnol* **21**: 546-552, 2003.
 - 18) Tsutsumi Y, Mayumi T: Creation of functional muteins using phage display system results in a novel PEGylation system. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **48**: 1519-1526, 2003.
 - 19) Okamoto T, et al: Optimal construction of non-immune scFv phage display libraries from mouse bone marrow and spleen established to select specific scFvs efficiently binding to antigen. *Biochem Biophys Res Commun* **323**: 583-591, 2004.

血栓と循環の検査法

第 27 回 血小板機能シリーズ No.10

MC-FAN 血液さらさら度への血小板の寄与

鎌田 春彦

独立行政法人医薬基盤研究所主任研究員、

三重大学大学院医学系研究科分子病態学

Kamata, Haruhiko

鈴木 宏治

三重大学大学院医学系研究科分子病態学教授

Suzuki, Koji

本邦における死亡原因のトップは依然として悪性腫瘍であるが、第二、第三の死亡原因は心筋梗塞や脳梗塞などの血栓性疾患であり、現在、これらの疾患の背景となる生活習慣病の増加が深刻な問題となっている。生活習慣病は、運動不足や過剰な栄養摂取、精神的・肉体的ストレスなどの不健康な生活習慣により誘発される疾患(高血圧や動脈硬化、肥満、糖尿病など)であり、こうした病態では恐らく血液は「どろどろ」状態となり、微小循環系の障害、そして組織の機能障害がスパイラル的に進行し、血栓症や臓器障害を来すと考えられている。しかし、実際に血液「どろどろ」状態がどのようにして生じるのか、そのメカニズムは明らかではない。一般に、健康の維持には血液「どろどろ」状態を改善して血液「さらさら」状態にすることが重要であると信じられている。現在、血液の「どろどろ」状態や「さらさら」状態を解析できる分析機器とし

ては、血液流動性測定装置 MC-FAN (microchannel array flow analyzer) が汎用されている¹⁾。本稿では、血液の「どろどろ・さらさら」状態と血小板との関わりを論じ、筆者らが得た測定結果の意義を考察してみたい。

血小板の機能と病態

血小板は、生理的な止血と病的な血栓形成のいずれにも関与する細胞成分である。直径 2 ~ 4 μm の核のない円盤型の血球で、骨髄巨核球から産生される。血小板の細胞表面にはインテグリンに代表される各種の糖蛋白質 glycoprotein (GP) が発現しており、細胞外基質との接着や血小板同士の凝集に関与している。

血管が損傷され内皮下組織が露呈される状況下では、血小板は様々な因子によって活性化され、細胞膜 GP を発現し、あるいは GP が活性化される。同時に、血小板の α 顆

粒と濃染顆粒 dense body からは von Willebrand 因子 (VWF) や第 V 因子、フィブリノゲンなどの凝固因子とともに、ADP やトロンボキサン A_2 (TXA₂) などの血小板凝集促進物質が放出され、より多くの血小板が活性化される。そして、活性化血小板膜 GPIIb/IIIa は VWF を仲介して内皮下コラーゲンに結合し、また血小板 GPVI は直接コラーゲンに結合して傷害部位に血小板が集積する。また、GPIIb/IIIa はフィブリノゲンを介して連結し、血小板凝集が惹起される。さらに、血小板膜上に発現した P-selectin は活性化白血球や白血球由来マイクロパーティクル (微小顆粒) に発現する P-selectin glycoprotein I ligand (PSGL)-1 に結合し、止血血栓の形成や病的血栓の形成に関与し、さらには動脈硬化にも関わる可能性も示唆されている²⁾。さらに、活性化血小板膜上にはホスファチジルセリンのような陰性荷電リン脂質が露呈し、このリン

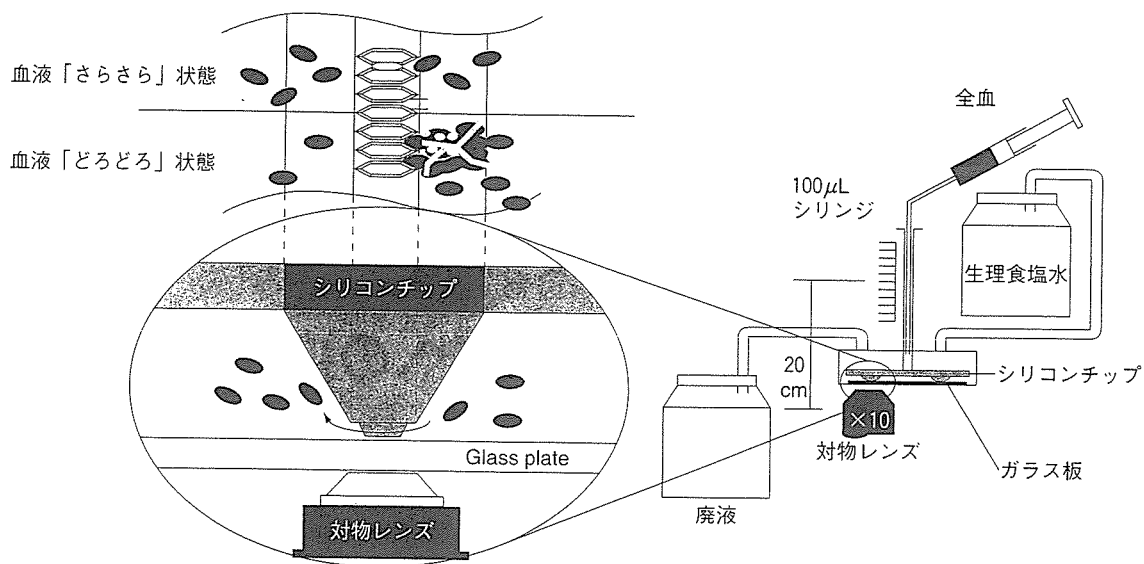


図1 MC-FANの概略

採血した全血をシリンジからシリコンチップへと添加し、血液の流れ(血液「さらさら」度)をモニターで観察しながら、定量的に測定できる。血液「さらさら」状態では、シリコンチップに刻まれた微小流路内を流れていくが、血液「どろどろ」状態では微小流路に血栓が詰まることで、血液が流れない様子が見られる。

脂質に血漿中や顆粒から分泌された凝固因子が結合し、血液凝固反応が効率的に進展する。こうして、血小板は血小板血栓の形成だけでなく、凝固血栓の形成にも重要な役割を果している。

血液の粘度について

血液粘度の上昇は心血管系疾患の危険因子であり、血液粘度を測定する医学的重要性は増している。血液粘度の上昇によって起こる循環障害を過粘性症候群(hyperviscosity syndrome)と呼び、様々な病態の基盤になることが多い³⁾。

血液粘度は、ずり速度に依存した非ニュートン流体であると考えられており、この性質は、血液構成成分

の流体力学的特性だけでなく、血球成分および血漿成分の間の生化学的ならびに摩擦的相互作用に基づいている。血流速度の高い、高ずり速度領域では、流動抵抗を減らすため赤血球は楕円板に変形し、血液の流れる方向に対して平行に配位する。他方、低ずり速度領域では、赤血球と血漿成分との相互作用が増して赤血球を含む凝固塊が形成される。これにより血液の流れは乱れ、流動性抵抗は大きくなるため血液粘度は増加する。血小板は細胞成分の中で最も小さく、数も赤血球に比べて少ないので血液の流動性に、そのままの状態ではほとんど影響しない。しかし、傷害された血管壁に接触することにより血小板が活性化され凝集すると、血液の流れの妨げになる。とりわけ、

血小板凝集塊の下流域には、ずり速度のきわめて小さい血液の溜まりが形成され、赤血球集合の形成が促進されると考えられ、こうした状態では微小血管は閉塞し血流は低下する。

他方、血漿の粘度は、主に血漿中の高分子物質の種類と濃度に依存しており、血漿蛋白質、とりわけフィブリノゲンのような繊維状分子は、流れの中での配向や温度の影響、血漿蛋白質の性質や状態によって変化する。したがって、フィブリノゲン濃度の増加は、血漿粘度を増加させる要因であり、心筋梗塞、脳虚血、脳梗塞、高血圧症などの心血管系疾患の危険因子になると考えられている⁴⁾。また、血漿中の脂質濃度も血栓症、狭心症、心筋梗塞など循環系の病気と密接に関連することから、

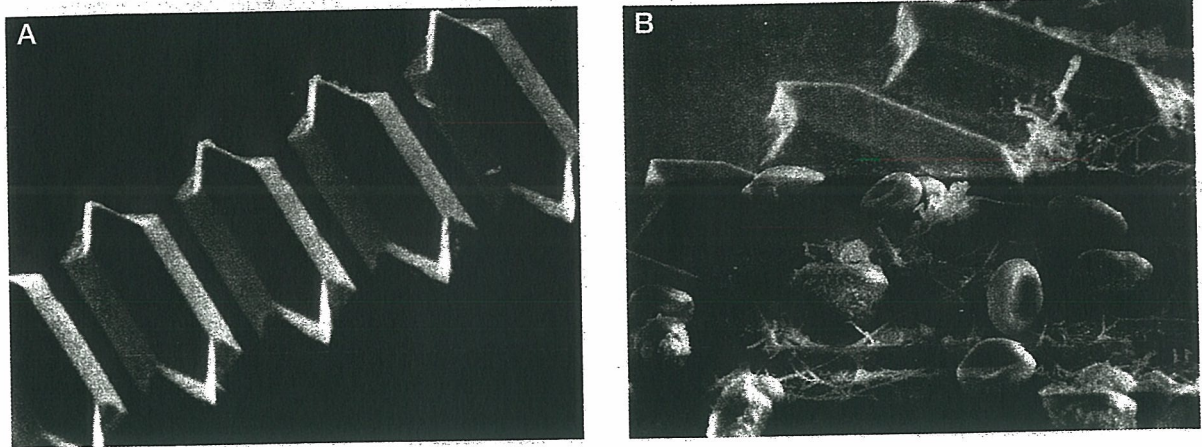


図2 シリコンチップの電子顕微鏡写真

A：血液添加前のシリコンチップ
 B：血液にADPを添加し、MC-FANにて血流測定を行った後のシリコンチップ。血小板凝集塊とフィブリンネットが形成され、その内部に赤血球が巻き込まれている。

血漿に含まれる各種の蛋白質、脂質などの成分の変化は、血液粘度に影響を及ぼし、血栓性疾患の直接的あるいは間接的な要因になると考えられる。

MC-FAN の特性

これまで、血小板の機能を解析するには、主に多血小板血漿 (platelet rich plasma：PRP) を用いて、血小板の凝集状態を可視光の透過度の変化として測定する血小板凝集計が用いられてきた。また、血小板浮遊液の微小流路の通過時間を計測する方法もあるが、いずれの方法も他の血球成分が含まれない条件下で測定されるので、血管内でみられるような多様な血球成分の共存下での血小板の凝集状態を解析するものではない。

血液流動性測定装置 MC-FAN は、半導体微細加工技術を用いて、シリコン単結晶基板に毛細血管(平均径 $6\ \mu\text{m}$) とほぼ同じ幅 ($7\ \mu\text{m}$) と深さ

($4.5\ \mu\text{m}$) (等価径 $6\ \mu\text{m}$) の微小流路が多数(約 8,700 個) 並列している溝の中を血液(全血)が通過する状態をカメラで撮影し、血液(主に赤血球)の通過状態から血液の流動性(粘度)を測定する装置である(図1)。流路の表面はシリコン加工されており、固相面と血球の相互作用は最小限にとどめてある。実際に MC-FAN で固相面と血小板の相互作用はほとんど観察されないが、血小板の凝集塊を解析することはできる。しかし、MC-FAN の特徴は、血小板の凝集状態を他の血球の存在下に観察できる点にあり、単に血小板の凝集状態を解析するというよりは、赤血球を中心とする全血の凝血状態を観察できることである。MC-FAN による血液「どろどろ」状態では、多数の並列した微小流路に血小板の凝集塊や、白血球の活性化によって生じた赤血球を巻き込んだ血液凝固塊が流路を塞ぎ、血流が妨げられる状況が映像として見られる

(図2)。こうした画像が、血管内での血液の流れとしてイメージ化され、血液「さらさら」や「どろどろ」として表現される。実際には、MC-FAN では、血液そのものの流動性を観察するというよりは、「微小流路を閉塞する血液凝固塊の形成過程(あるいは凝固塊のできやすさ)を定性・定量的に観察する」と表現するほうが真実により近いといえよう。

血液さらさら度と血小板の関係

それでは、MC-FAN でみられる血液「どろどろ」の生理的意義はどのようなものだろうか？ 先述したように、MC-FAN における血液流動性には、微小流路を通過する血球成分、特に存在比の多い赤血球の変形能が大きな影響を及ぼすと考えられる。しかし、一般の健常者には、抗体などの赤血球凝集素の影響を除けば、赤血球の変形能の低下を招くような後天的あるいは先天性要因が

あるとは考えられない。したがって、血小板凝集塊や血液凝固塊によって流路が閉塞されて生じる血流低下を観察する本装置においては、赤血球よりもむしろ血小板や白血球がどれだけ活性化されたかを測定しているものと考えられる⁹⁾。

多くの生活習慣病では、健常状態と比較して、血小板の機能的変化が認められている⁶⁾。実際、糖尿病患者における血小板の機能変化と心血管障害の発症との関連性を示唆する報告がなされており、糖尿病に罹患することで血小板がコラーゲンに対して高感受性になるとの報告がある⁷⁾。また、高脂血症においても糖尿病と同様に、血小板は高感受性になっていることが知られている。Taylorらは、血漿コレステロール値の上昇が、血小板および血管内皮細胞の機能的変化を惹起し、特に血小板上に発現するP-セレクチンにより、血小板と血管内皮の接着が促進されることで、向血栓性へと変化すると報告している⁸⁾⁹⁾。したがって、MC-FANの測定により観察される流路の閉塞は、例えば、糖尿病性網膜症の末梢血管の状態を一部反映しているかもしれない。すなわち、目の網膜には眼球や周囲組織に栄養や酸素を供給するための細小血管が張りめぐらされているが、このような血管が糖尿病性機能障害を受けると血小板凝集塊やフィブリンからなる微小血栓が、微小血管を梗塞して糖尿病性網膜症が発症すると考えられている。MC-FANによって観察される微小流路の閉塞と血流低下はこのような過程を *in vitro* で再現しているものと考えられる。実際に血管

内で起こる血液凝固過程は非常に複雑であり、MC-FANでの解析画像が微小血管内の病態変化そのものを忠実に再現しているとは考えられない。しかし、MC-FANで見られる血液「どろどろ」状態は、糖尿病や高脂血症などの生活習慣病患者に見られるアゴニスト高感受性血小板の活性化状態を反映している可能性があると考えられる。

MC-FANの医薬品・機能性食品開発への応用

血小板を人為的に活性化し、MC-FANを用いて血流が低下した状態を定量化できれば、血流を改善させる薬物の開発に応用できる可能性がある。血液の凝固過程は、前記したように、異物により活性化された白血球あるいは血小板が、血漿成分と相互反応しながら進行するものであり、こうして生じた血栓は、微小循環障害を来す。われわれは、このような状態を想定し、バクテリア由来のリポ多糖(LPS, エンドトキシン)等で全血を刺激し、白血球を活性化させたときの血液流動性をMC-FANを用いて測定した。その結果、LPSは濃度依存性に血流低下を惹起し、この血流低下は、凝固阻害剤や血小板凝集阻害剤の濃度依存性に改善されることを示した¹⁰⁾。また、ADP等の血小板凝集惹起物の添加によりMC-FAN観察で血流が低下し、この血液「どろどろ」状態を血小板凝集阻害剤は濃度依存性に有意に抑制した(投稿中)。こうした結果から、MC-FANは、高濃度に白血球や血小板の活性化に基づ

く微小血栓の形成を血流低下として定量化できる点で有用であり、また、凝固阻害剤や血小板凝集阻害剤などの治療薬のスクリーニングにも有用であることが示唆された。われわれは、現在、生活習慣病における血流障害を改善する機能性食品の開発にもMC-FANが有用であることを認めている。

展 望

本稿では、MC-FANによる血流測定に及ぼす血小板や白血球の影響について、われわれの私見を中心に概説した。MC-FANを用いた解析による血液「さらさら」状態は、血液中の血小板や白血球が活性化されていないことを示唆するものであろうが、患者の健康状態を診断できるか否か、その科学的根拠はあまりない。高脂血症や高血圧、糖尿病などの生活習慣病では血小板機能は影響を受けており、これが血液「さらさら」度に影響を及ぼすことは想像できるが、生活習慣病では血管内皮の機能障害も、血栓形成における重要な要因になっている。すなわち、被験者の血管内皮に問題があれば、仮にMC-FAN測定により血液「さらさら」であっても、健康とは言えない。さらに、われわれの結果でも、生活習慣病と無縁な若年健常者の血液でも、採血状態や採血後の血液の保管状態によって、血液「どろどろ」状態になることがあり、MC-FAN測定では、採血法とその後の血液管理には細心の注意を払う必要がある。また、MC-FAN測定による血液「さらさら」と「どろどろ」が真に