

プロテオーム創薬に叶う DDS 基盤技術の開発

堤 康央¹⁾

Development of Novel DDS Technologies for Pharmacoproteomic-based Drug Discovery and Development

Yasuo TSUTSUMI¹⁾Department of Biopharmaceutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
1-6 Yamadaoka, Suita 565-0871, Japan

(Received July 1, 2004)

With the success of the Human Genome Project, the focus of life science research has shifted to the functional and structural analyses of proteins, such as proteomics and structural genomics. These novel approaches to the analysis of proteins, including newly identified ones, are expected to help in the identification and development of protein therapies for various diseases. Thus pharmacoproteomic-based drug discovery currently has a very high profile. Nevertheless, the use of bioactive proteins in the clinical setting is not straightforward because *in vivo* these proteins have low stability and pleiotropic action. To promote pharmacoproteomic-based drug discovery and development, we have attempted to establish a system for creating functional mutant proteins (muteins) with the desired properties and to develop a site-specific bioconjugation system for further improving their therapeutic potency. These innovative protein-drug systems are discussed in this review.

Key words—phage display system; proteomics; bioconjugation; protein therapy; targeting

1. はじめに

20 世紀後半の遺伝子・蛋白質工学や分子細胞生物学の目覚ましい進歩も相まって、疾病治療に有望視された種々生理活性蛋白質が同定され、サイトカインを初めとする蛋白質が難治性疾患に対する“夢の治療薬”として期待された。この流れは昨今のヒトゲノムプロジェクトの完了宣言を受け、さらに加速度を増してきている。すなわちヒトゲノム解読により、約 3 万種の遺伝子のうち半数は未知蛋白質をコードしており、これらの中には疾病に深く関与する蛋白質、言い換えれば医薬品シーズや創薬ターゲットとなり得る疾患関連蛋白質が多数含まれるものと期待されている。その結果、創薬を指向したポストゲノム研究は、疾患状態における多種多様な蛋白質の時空間的・質量的な発現様式と疾患の発症・増悪・治癒との連関を網羅的に解析しようとする疾患

プロテオミクスなどへと集約されつつある。そのため、疾患プロテオミクス情報などを有効活用し、疾病治療に有効な蛋白質を創製しようとするプロテオーム創薬に大きな注目が集まっている。

周知の通り、20 世紀後半には数多くの生理活性蛋白質が同定され、種々難治性疾患に対して臨床応用が試みられた。しかしながら、これら生理活性蛋白質は切れ味鋭い作用を有するものの、その生体内安定性が極めて乏しいために、臨床応用する際には生体内のホメオスタシスを無視した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う。さらには、サイトカインなどは一般に複数種のレセプターを介し、多様な *in vivo* 生理活性を有するために、目的とする治療作用以外の作用をも同時に発現してしまう。そのため、生理活性蛋白質の臨床応用は著しく制限されており、そのほとんどが医薬品化されていない。したがって、疾患プロテオミクス情報などを有効活用したプロテオーム創薬を推進し、有効かつ安全な蛋白療法を確立していくためには、これら蛋白質固有の問題点を克服し得る創薬テクノロジー、すなわち蛋白療法の最適化を目指した

大阪大学薬学研究科薬剤学分野 (〒565-0871 吹田市山田丘 1-6)

e-mail: ytsutsumi@nihs.go.jp

本総説は、平成 16 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

DDS (Drug Delivery System) の確立が依然として必須となっている。この創薬テクノロジーは、言わば疾患プロテオミクス研究といったポストゲノム基礎研究とプロテオーム創薬や蛋白療法との架け橋になるものと考えられる。

本観点から現在、1) レセプター親和性・特異性などが高く医薬価値に優れた機能性人工蛋白質を迅速創製できる蛋白質分子進化戦略の構築、²⁾ 2) 蛋白質の生体内安定性を向上させ、かつ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ション法の確立、^{2,3)} 3) DDS 機能 (標的指向能・薬物徐放化能等) を有した機能化高分子キャリアの設計⁴⁾ に焦点を絞り、上記3者を融合させた「プロテオーム創薬に叶う DDS 基盤テクノロジー」の確立を図っている。本稿では、紙面の許す限り詳細に、上述した1)–3)の DDS 基盤テクノロジーについて紹介させて頂く。

2. 医薬価値に優れた機能性人工蛋白質の創製システムの構築

蛋白療法の最適化に向け、従来から産・官・学の多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた“生理活性蛋白質のアミノ酸置換体 (機能性人工蛋白質)”を創製するため、Kunkel 法などの点突然変異法を用いた構造変異体の作製を精力的に試みている。^{3,5)} しかし点突然変異法では、まず構造変異体の立体構造や機能をシミュレーションし、トライ・アンド・エラーで生理活性蛋白質の構成アミノ酸を1つずつ別の特定アミノ酸に改変することにより、個々の構造変異体を作製せねばならない。そのうえで目的とする機能性人工蛋白質を同定するため、作製した構造変異体の機能を個別に評価する必要がある。そのため従来法では、膨大な時間・労力を費やすばかりか、作製し得る構造変異体の多様性 (種類) にも限界があり、期待通りの成果は得られていないのが現状である。

一方で近年、バクテリオファージの生活環を巧みに利用し、ターゲット (分子・粒子・細胞) への高親和性結合分子を網羅的かつ迅速に探索・同定し得る基盤技術としてファージ表面提示法が考案された⁶⁾ (Fig. 1)。このファージ表面提示法の際立った特徴は、1) g3p などのファージ外殻蛋白質をコードした遺伝子の5'末端領域に、任意の外來性遺伝子を組み込んだファージゲノム (若しくはファージ

ミドベクター) を構築することで、その外來性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を観た場合、遺伝型 (ファージ粒子に内封されている外來性遺伝子) 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得ないことに起因する)、3) 別々の外來性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多様性に富んだライブラリとして容易に調整できること、4) 宿主菌に感染させることで簡便に特定ファージやライブラリファージを増幅できることなどにある。そのため、ファージ表面に数千万から数十億種類以上もの多様性に富んだランダムペプチドやナイーブ抗体、cDNA 由来蛋白質などを発現させたファージライブラリを構築し、このライブラリの中から、ターゲットへ高親和性に結合するファージを選択・回収、増幅するという操作 (パンニング) を繰り返すことにより、ターゲットに対する高親和性結合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目的の蛋白質をコードする遺伝子を内封しているため、その遺伝子配列をも同時に得られる。そのため、このファージ表面提示法は様々な結合分子を迅速かつ網羅的にスクリーニングし得る基盤技術として、その応用範囲が急速に広がりつつある。しかしながらこのファージ表面提示法は、現在までのところ特定ターゲットに親和性を有する抗体やペプチドを同定する手段として利用されているに過ぎなかった。そもそもサイトカインなどの生理活性蛋白質をファージ表面に提示させた例すら皆無であった。

本研究では以上の点に着目し、ファージ表面提示法を独自に改良することにより 10^8 種類以上もの多様性を有した構造変異蛋白質 (生理活性蛋白質のアミノ酸置換体) を一挙に Combinatorial Biosynthesis し、この構造変異体ライブラリの中から、レセプター親和性や特異性などが向上した“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同定できる「プロテオーム創薬のための蛋白質分子進化戦略」を確立した。²⁾ ここでは一例として腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor- α ; TNF- α) をモデルとした機能性人工蛋白質の創製に関して述べさせていただく。

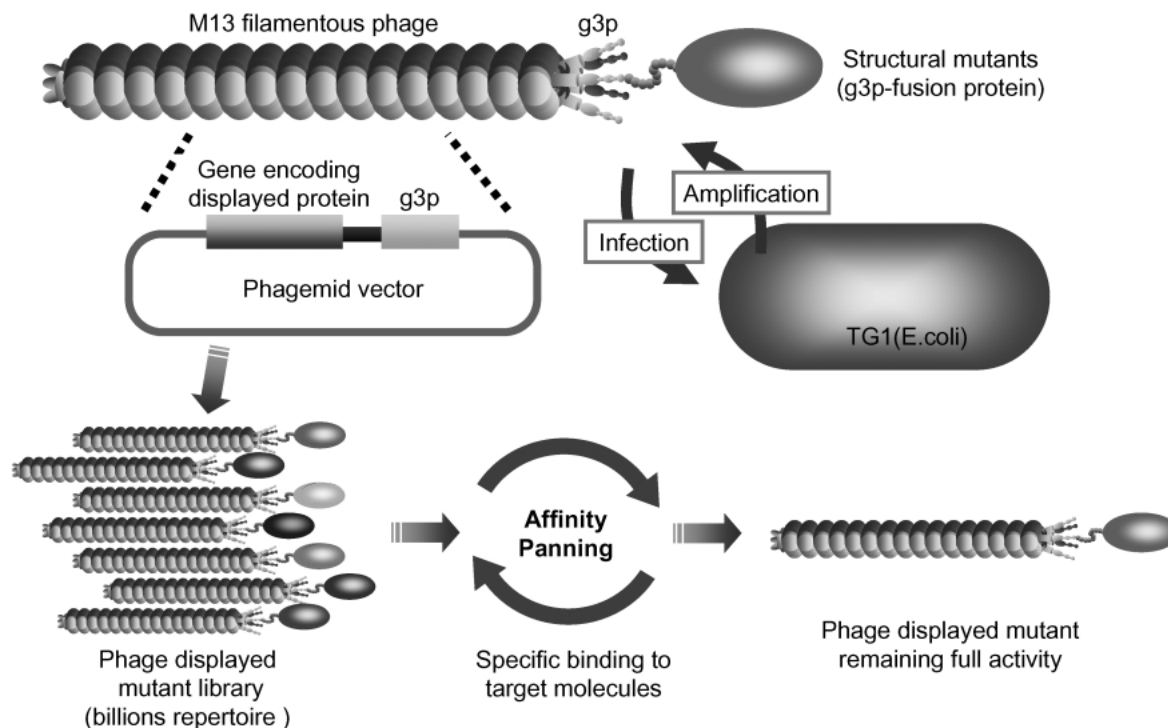


Fig. 1. Creation of Functional Mutein Using Phage Display System

Phage display system has the following main characteristics: 1) proteins can be displayed on the outer shell of the phage where they can interact with their target molecules, such as a receptor or antigen. These protein-displaying phage particles are produced by the integration of a foreign gene into the 5'-terminus of the gene that encodes the outer shell of the phage (*i.e.* g3p) in phagemid vector or phage genome; 2) the genotype of this phage (the foreign gene inside the phage clone), corresponds with the phenotype (the protein displayed on the phage's surface); 3) phage particles or "libraries", can readily be made, which consist of billions of varieties of protein; 4) a selected phage from the library can be readily amplified by infection of a host bacterial cell. It is therefore possible to screen for, and then isolate, high-affinity binders to target molecules from the phage library. Additionally, since isolated phage clones contain a gene sequence that codes for the desired protein, this also allows information of their amino acid sequence to be obtained.

3. 医薬価値に優れた機能性人工 TNF- α の創製

TNF- α は、BCG (Bacillus Calmette-Guerin) 感作マウスにリポ多糖 (LPS) を投与した際に血液中に検出され、さらに Meth-A 繊維芽肉腫の出血壊死を惹起する生理活性蛋白質として 1975 年に見出された。⁷⁾ TNF- α は 157 個のアミノ酸からなる分子量 17000、等電点 5.3 の生理活性蛋白質であり、その分子構造内に 6 個のリジン残基を含有している。⁸⁾ また、痕跡程度に糖鎖を有していることや分子内ジスルフィド結合を有していることが知られている。さらに TNF- α は、水溶液中では 2 枚の β シートが折り重なったサンドウィッチ状の構造を形成し、ホモフィリックな三量体として存在する。⁹⁾

当初 TNF- α は、*in vitro* における検討から、腫瘍細胞に対しては細胞傷害性を示すものの、正常組織細胞に対してはほとんど傷害性を示さないものと考えられていた。^{10,11)} そのため、1980 年代に飛躍的進歩を遂げた遺伝子工学技術により大量生産可能となった TNF- α を「夢の抗癌剤」として、臨床応用し

ようとする試みがセンセーショナルに進められてきた。¹²⁾ しかしながら、ほかの生理活性蛋白質でも観られたように、TNF- α は体内安定性が極めて乏しいために (血中半減期: 数分から数十分程度)、臨床応用の際には、生体内のホメオスタシスを無視した大量頻回投与を余儀なくされ、発熱、悪心、嘔吐、血圧低下、消化管障害、エンドトキシン様ショックなど、非常に強い副作用を招いてしまった。¹³⁻¹⁵⁾ これら重篤な副作用のため、全身性の抗腫瘍薬として TNF- α を用いる場合、その投与量は抗腫瘍作用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ものと結論付けられた。そのため、現在の TNF- α による癌化学療法では、局所投与 (腫瘍内投与や癌支配動脈への動脈内投与) に限定されてしまっている。¹⁶⁻¹⁸⁾ しかし一方で、この TNF- α の局所投与による固形癌の奏功率は目を見張るものがあり、依然として TNF- α の全身性抗癌剤としての適用のみならず、腫瘍血管における物質透過性の選択的亢進剤や抗腫瘍免疫活性化剤として

の全身的応用に期待が持たれている。以上の課題は、インターフェロン- γ 、インターロイキン-2を始めとするサイトカインだけでなく、数多くの生理活性蛋白質にも当てはまることである。¹⁹⁻²¹⁾

さて、TNF- α の抗腫瘍作用は、1) 直接的な腫瘍細胞傷害、2) 血中の抗腫瘍エフェクター免疫細胞の活性化、3) 腫瘍血管の特異的崩壊により発現するものと考えられている (Fig. 2).²²⁾ なかでも3)の腫瘍出血壊死作用は、正常血管のみならず炎症部位新生血管でさえ全く生じず、TNF- α の特筆すべき特異性の高い抗腫瘍効果であることを認めている。²³⁾ しかし、最近まではこの腫瘍血管に対する選択的な作用機構の詳細はあまり知られていなかった。これまでの研究から、血管内皮細胞は、周りの組織細胞から分泌される液性因子や細胞外マトリックスなどの影響により組織特有の性質を保持形成しており、この組織特異的な性質は、*in vitro*においてCo-cultureや培養上清(ならし培地)などを用いた系によって再現できることを見出している。^{24,25)} そこで、各種腫瘍細胞の培養上清を用いて血管内皮細胞を培養することにより、腫瘍環境下における血管内皮細胞のTNF- α 感受性を検討した。

通常の培養条件(10% FCSを含むDMEM培地)や正常な血管内皮細胞の培養上清を用いて培養した場合は、1000単位/mlのTNF- α 濃度においても血管内皮細胞は全く傷害を受けず、高いTNF- α 抵抗性が観察された。一方、Meth-A繊維芽肉腫細胞の培養上清で培養した血管内皮細胞では、わずか10単位/mlのTNF- α 濃度で著明な障害性が認められた。この現象は、B16-BL6メラノーマ細胞やColon-26アデノカルシノーマ細胞などの他の腫瘍細胞の培養上清でも観察され、Meth-A繊維芽肉腫細胞の培養上清と同様にTNF- α に対する血管内皮細胞の感受性が上昇した。以上のことからTNF- α は、多くの腫瘍株に対して腫瘍血管を特異的に傷害することで、抗腫瘍効果を示すものと考えられた。加えて、最近の報告では腫瘍血管内皮細胞におけるEndothelial monocyte activating polypeptide II (EMAP II)の発現が、TNF- α の抗腫瘍作用の選択的発現に重要な役割を担っていることも示唆されている。²⁶⁾ すなわち、TNF- α の血中滞留性を向上させることは、前述の1)から3)に示したTNF- α の抗腫瘍作用のすべてを活性化することにつながるものと考えられる。また、血中から肝臓などの血管外組織に移

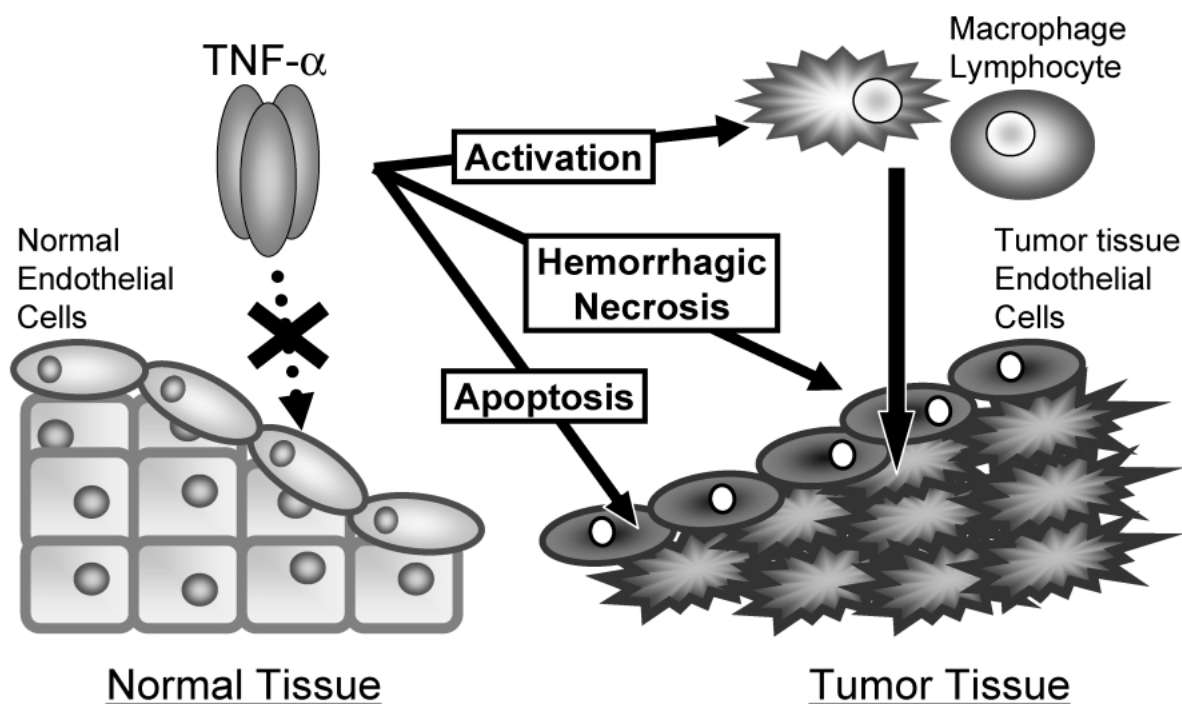


Fig. 2. Mechanism of Anti-Tumor Effect of TNF- α

The anti-tumor effect of TNF- α is known to result not only from its direct cytotoxicity against tumor cells but also from activation of anti-tumor effector immune cells in the blood, such as macrophages, cytotoxic lymphocytes, and neutrophils, and furthermore from specific damage to tumor blood vessels.

行してしまった TNF- α が副作用の主因となるため、^{27,28)} 血中滞留性の向上に伴う正常組織への移行性の低下は、副作用軽減にも直結するものと期待できる。

以上の観点から、本研究では TNF- α をモデル蛋白質と捉え、レセプター親和性や生物活性、血中滞留性などが向上したリジン欠損 TNF- α を創製することで初めて可能となる、後述の“部位特異的高分子バイオコンジュゲーション法”を適用することで、TNF- α の血中滞留性・体内安定性をさらに向上させ、TNF- α の多様な *in vivo* 作用の中から目的とする抗腫瘍作用のみを選択発現させることを試みた。

さて TNF- α の場合、アラニン・スキャンといった従来の点突然変異法を用いた構造-活性相関研究により、TNF- α の Lys11 や Lys65・Lys90 はその立体構造（三量体）形成やレセプター結合に必須と言われていた。これは TNF- α に限らず、一般にリジン残基は多くの場合、生理活性蛋白質の高次構造形成やリガンド-レセプター結合などに必須の役割を担っているため、他のアミノ酸への置換は致命的な活性低下を招いてしまうことが、従来までの点突然変異解析によって常識となっていた。事実これまで、蛋白質中のリジン残基すべてを欠損させ得た例（リジン欠損体）は皆無であった。しかしわれわれはこの既成概念を覆す知見、すなわち Lys11 や Lys65・Lys90 を含む全 6 個のリジン残基を一挙に他のアミノ酸へ置換しても、wild 型 TNF- α (wTNF- α) と同等さらには 10 倍以上もの生物活性を有するリジン欠損 TNF- α を創製することに初めて成功した (Fig. 3)。この wTNF- α と同等以上の生物活性を有する種々のリジン欠損 TNF- α は、BIAcore を用いた TNF レセプター I や TNF レセプター II への結合性評価により、wTNF- α と同等以上のレセプター親和性を有していること、超遠心解析やゲル濾過解析から三量体を形成していることも確認している。これらの知見は、TNF- α 分子中の全 6 個のリジン残基を他のアミノ酸へ一挙かつ網羅的に置換した 20⁶ (6400 万) 種類もの構造変異 TNF- α (アミノ酸置換体) を表面提示したファージライブラリを作製したうえで、TNF レセプター I や抗 TNF 中和抗体に対するアフィニティー・バイオパニングを行い、これら構造変異 TNF- α の諸機能を高速解析することによって得られたものであ

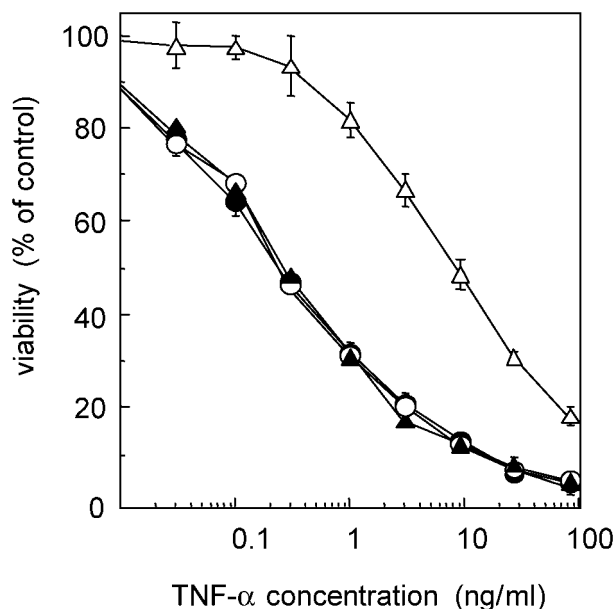


Fig. 3. *In vitro* Bioactivity of Mono-PEGylated TNF- α s

The specific activity of TNF- α s was measured by a cytotoxicity assay using L-M cells in the presence of actinomycin D. Each data value represents the mean \pm S.D. ○: wTNF- α , □: ran-PEG-TNF- α (randomly mono-PEGylated wTNF- α with linear-type PEG5000, ●: mTNF- α -Lys(-), ▲: sp-PEG-mTNF- α (N-terminus specific mono-PEGylated mTNF- α -Lys(-)).

る。本方法を駆使することにより現在までに、レセプター指向性（選択性）や体内安定性に優れた機能性人工 TNF- α も多数得ており、TNF- α 以外の種々レセプター蛋白質や抗体についても、活性を保持したリジン欠損体などを数多く得ている。したがって本研究で確立した「ファージ表面提示法を駆使した機能性人工蛋白質の創製システム」は、“プロテオーム創薬のための競争力 (DDS 基盤テクノロジー)”を提供するだけでなく、従来までの点突然変異法（アラニン・スキャン）では得られなかった“蛋白改変の概念”や“蛋白質の構造-活性相関概念”をも新たに提唱するものである。

プロテオーム創薬は、疾患プロテオミクス及び構造ゲノミクスなどの進展と、これらの知見を統括したバイオインフォマティクスが駆動力となり、近い将来、上記の「医薬価値に優れた機能性人工蛋白質を迅速創製できる蛋白質分子進化戦略」との融合により加速度的に推進されるものと期待される。一方でこのようなプロテオーム創薬を指向したバイオインフォマティクスの進展は、蛋白質のアミノ酸配列と立体構造、機能との連関を理解可能とするため、近未来的にはアミノ酸配列が与えられれば、その配列から未知蛋白質の構造と機能が予測し得よう。こ

これは逆に欲する機能と立体構造を有したアミノ酸配列のデザインを可能とするだけでなく、このアミノ酸配列が有する立体構造やその機能を模倣した有機化合物の合理的設計をも可能とする。このようなバイオインフォマティクスをシステムアップするためには、未知蛋白質の機能解明や立体構造解析に加え、種々の蛋白質について膨大な多様性を有する構造変異体を網羅的に作製し、レセプター・リガンド結合の様式、生物活性などをも含めた機能情報を集積し、立体構造との連関を追求しなければならない。この点本研究で開発した「機能性人工蛋白質の迅速かつ網羅的創製システム」は、視点を変えればわずか1週間で 10^8 種類以上もの多様性を有する構造変異体ライブラリを作製し、その機能情報を高速集積し得る基盤技術と言える。本観点からわれわれは現在、上述の機能性人工TNF- α を含む様々な蛋白質の構造変異体の機能評価とともに、そのX線結晶構造解析を進めており、近未来的にバイオイン

フォマティクスへの研究展開を図ろうとしている。

4. 新たな部位特異的バイオコンジュゲーション法の確立

主として1980年代以降、DDSを視野においた医薬品開発の分野において、生理活性蛋白質の生体内安定性を改善するために、ポリエチレングリコール(PEG)などの水溶性高分子を蛋白質に結合させた、いわゆる高分子バイオコンジュゲーションが考案されてきた。^{2-4,29,30)}この中でPEGによる生理活性蛋白質のバイオコンジュゲーションは特にPEGylationと呼ばれている。この蛋白質のバイオコンジュゲーションは、分子量増大による腎排泄速度の減少をもたらすだけでなく、バイオコンジュゲーションに用いた修飾高分子により蛋白質の分子表面が覆われるために、プロテアーゼからの攻撃が立体障害的にブロックされ、結果として蛋白質の生体内半減期が延長される(Fig. 4)。同様の立体障害効果によって、免疫応答においても抗原性及び免

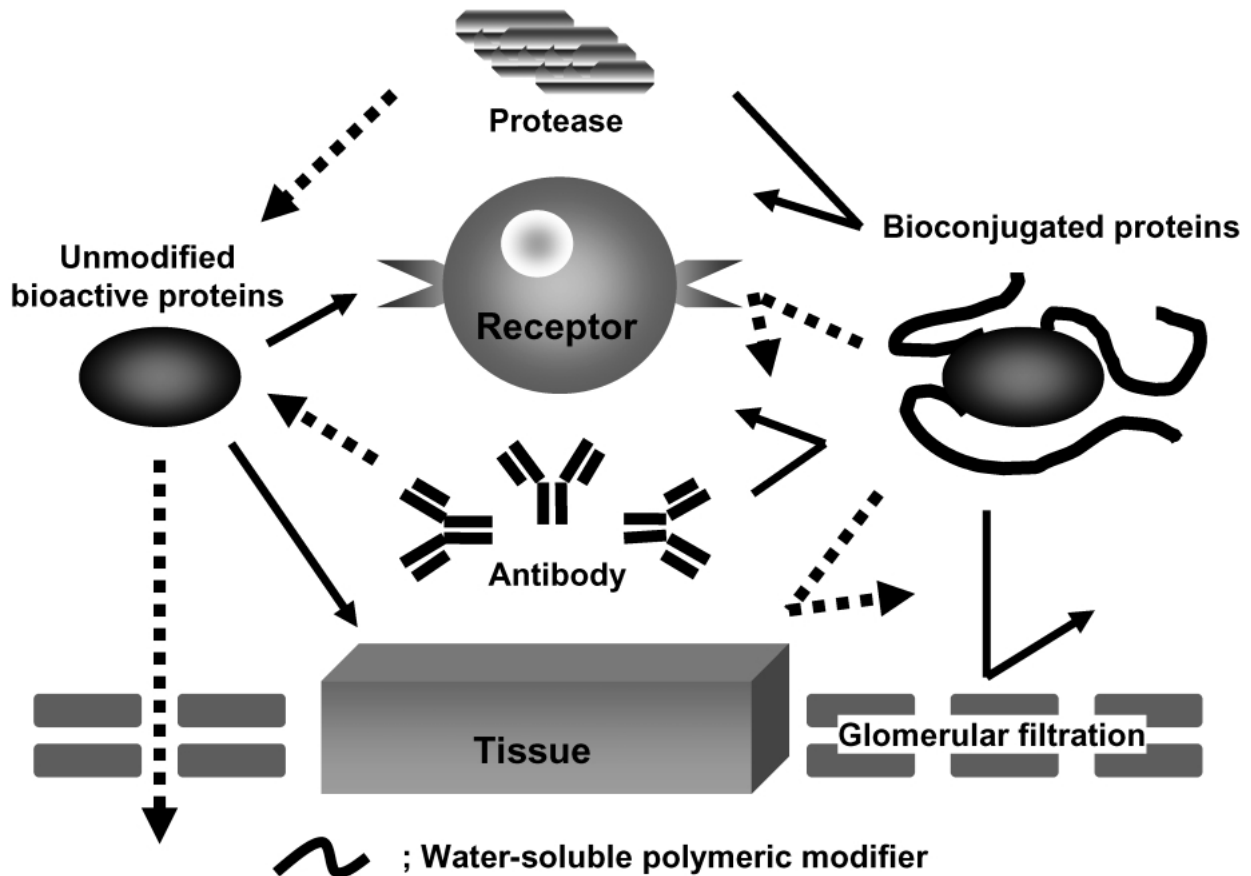


Fig. 4. Characteristics of Bioconjugated Proteins

Bioconjugated proteins with water-soluble polymeric modifiers increase their molecular size and steric hindrance, resulting in augmented plasma half-lives and stability. The medical implication of this is that PEGylation enables the therapeutic dose and frequency to be decreased.

疫原性が低下し、体内クリアランスの減少に直結する。以上に述べた総合的な体内安定化効果により、最終的に蛋白質の生体への投与量・回数を削減することが可能となる。このバイオコンジュゲーションは、数ある DDS の中でも蛋白質の医薬品化に向けた最適 DDS と位置付けられてきたが、その適用は最近まで Adenosine Deaminase や Superoxide Dismutase (SOD) といった低分子物質を基質とする酵素に限局されていた。この点に関してわれわれは、バイオコンジュゲート化 SOD の比活性が、用いた修飾高分子の分子量とは無関係に活性発現部位に結合した修飾高分子の数、すなわち修飾率の増加によって一義的に決定されることを認めている (Fig. 3)。以上の事実は、SOD のように低分子物質を基質とする酵素の場合、結合した修飾高分子が形成する立体障害の影響を受けることなく、自由に酵素-基質複合体形成が可能となることを意味している。一方で高分子レセプターとの結合により生理活性を発現するインターロイキン-6 (IL-6) の場合³¹⁾、修飾率の増大により比活性が低下し、その低下の程度は用いた修飾高分子の分子量の増大に伴って著しくなった (Fig. 5)。したがって、活性発現に高分子レセプターとの結合を要する蛋白質においては、活性発現部位への高分子導入による避け得ない活性低下のみならず、修飾高分子が形成する立体障害に起因したりガンド-レセプター複合体の形成阻害による活性低下をも、同時に考慮しなければならない。すなわちサイトカインなどのバイオコンジュゲーションは、修飾高分子が大きければ大きいほど、プロテアーゼからの攻撃を立体障害的にブロックできるが、同時にレセプター結合をも阻害してしまうため、致命的な比活性の低下を招いてしまう。さらにバイオコンジュゲーションによる分子量増大は、腎排泄速度の減少に伴う血中滞留性の向上を果たすが、これは逆に血中から組織への移行を極度に制限してしまうことになる。このように活性発現に高分子レセプターとの結合を要する生理活性蛋白質のバイオコンジュゲーションは両刃の剣となる。

これらバイオコンジュゲーションの問題点を踏まえたうえで、抗腫瘍サイトカインとして期待されている TNF- α や血小板産生促進因子としての IL-6 などをモデル生理活性蛋白質として用い、バイオコンジュゲーション法のグレードアップを図ってき

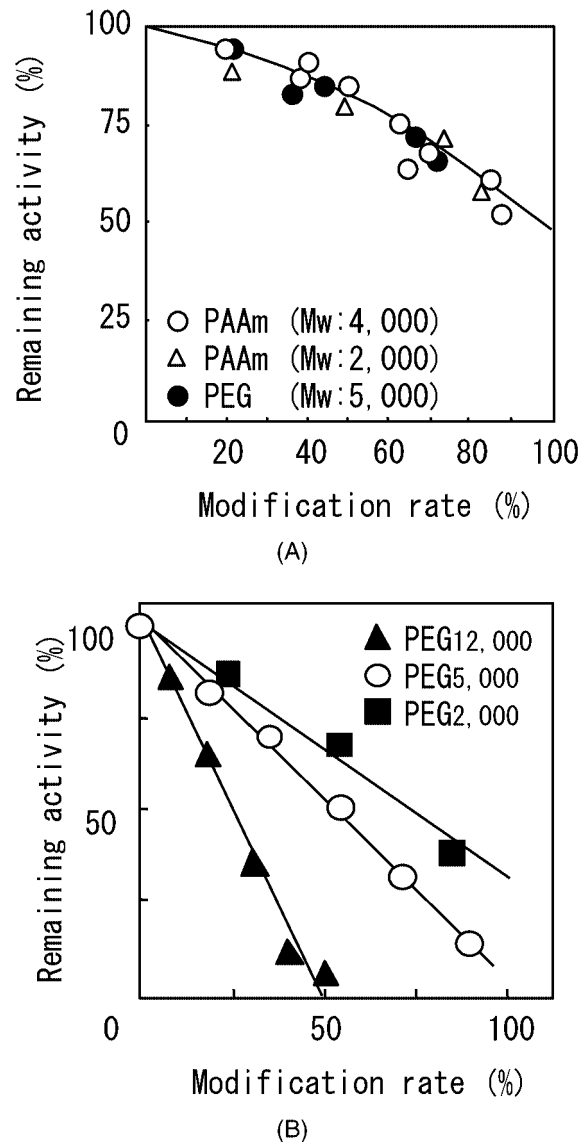


Fig. 5. Relationship between Remaining Activity and Modification Rate

A) The activity of bioconjugated SOD is independent of the molecular weight of polymeric modifier, but is proportional to the number of chemical modifications to active sites. PAAm: polyacrylamide, PEG: polyethylene glycol. B) The loss of activity of bioconjugated IL-6 is affected by both the modification rate and the molecular weight of the polymeric modifier.

た。³¹⁻³⁴⁾ その結果、1) 蛋白質の作用メカニズムを考慮し、最適の修飾高分子を選択したうえで、2) 比活性-修飾率 (水溶性高分子導入率)-分子サイズなどの相関を詳細に検討し、最適条件を見出すことにより、*in vitro* における比活性低下は避け得ないものの *in vivo* においては、i) 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、ii) その生体内挙動 (組織移行性) を制御し得ること、iii) 多様な *in vivo* 作用の中から、目的とする治療

作用と副作用の原因となる作用を選択分離し、目的作用のみを数百倍にも高め得ることを明らかにした。この iii) の生理活性蛋白質への作用の選択性付与は、体内安定性の向上に伴う投与量の削減や副作用発現組織への移行性低下によることを見出しており、例えばこれまでに PEG 化 TNF- α や PEG 化 IL-6 の場合、副作用を増幅することなく目的とする抗腫瘍効果や血小板産生促進効果がそれぞれ 100 倍及び 500 倍にも選択増強されることを認めている (Fig. 6)。このような背景から近年では、活性発現に高分子レセプターとの結合を要する生理活性蛋白質のバイオコンジュゲーションが世界的に試みられるようになり、最近 PEG 化インターフェロン- α が C 型肝炎に対する特効薬として上市された。

しかしながら、バイオコンジュゲーションは蛋白質に高い品質保証を付与できる最適 DDS と世界的に認識されているものの、依然としてそ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。これまで汎用されてきたバイオコンジュゲーション法は、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。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化蛋白質が得られる。し

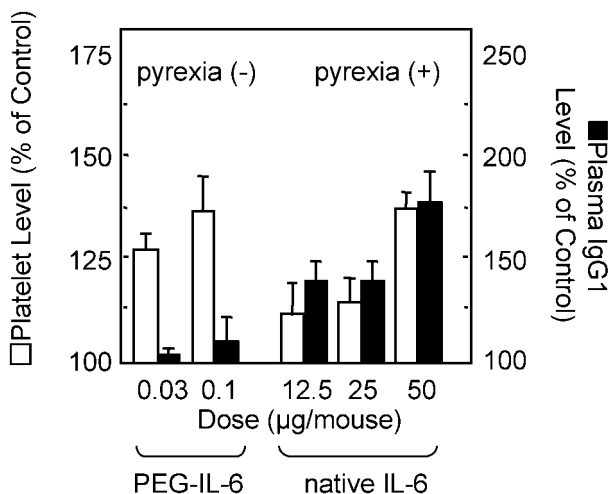


Fig. 6. PEGylation of IL-6 Effectively and Selectively Increases Its Thrombopoietic Potency

Thrombopoietic potency of PEGylated IL-6 increases more than 500-fold without compromising the incidence of undesirable side effects such as pyrexia and the introduction of antibody production.

かし、修飾高分子のアミノ基への結合はランダムであり、その結合部位を厳密に制御することはできない。周知の通り、ほとん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-レセプター間結合などにも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、蛋白質の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る。その結果、バイオコンジュゲート体は比活性や体内挙動、安定性などの機能面でもヘテロな集団となってしまう。しかし現状では、ほかに適切な蛋白質の DDS が存在しないため、このような問題点を抱えつつも、蛋白質の有効性と安全性確保の観点から、このランダムなバイオコンジュゲーションを医薬開発に適用せざるを得ない (現在 C 型肝炎の特効薬として期待されている PEG 化 IFN- α は、残存活性 10—30% のヘテロ集団であることが報告されている)。したがって、疾患プロテオミクス情報を有効活用した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方法の確立が待望されている。

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。³⁾ 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、予期せぬ活性低下を招いてしまう。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においても、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を得られないという致命的問題を抱えている。したがって、ポストゲノム新時代の創薬テクノロジーとしてバイオコンジュゲーションをシステムアップしていくためには、アミノ基をターゲットとしたバイオコンジュゲーションと同様の良好な高分子導入効率を保ったまま、修飾部位を局限し得るテクノロジーの確立が必須となっている。

この点、前述した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を迅速創製できる蛋白質分子進化戦略」との融合アプローチにより、完全に活性を保持したリジン欠損機能性人工蛋白質を創製することによって、「N末端アミノ基だけを標的とした部位特異的バイオコンジュゲーション」に初めて成功した。²⁾ このリジン欠損機能性人工蛋白質に対する部位特異的バイオコンジュゲーションは、N末端アミノ基にのみ高分子導入されるため、分子的均一性に優れたバイオコンジュゲート体がほぼ100%の収率で得られる。例えばTNF- α の場合、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は三量体形成や立体構造の維持に重要な役割を担っていることが判明している。³⁵⁾ またArg32—Leu36, Ala84—Val91などの残基がサブユニットの間にまたがってクラスターを形成し、レセプター結合部位となっており、この部分に存在するLys90に加え、Lys65も活性発現に重要な役割を果たしているものと考えられている。^{36,37)} したがって、アミノ基に対するランダムなバイオコンジュゲーション法では、これら活性発現や構造形成に参与するリジン残基(Lys11・Lys65・Lys90)までもが修飾されてしまうため、活性低下を避け得なかった。事実、wTNF- α のアミノ基に対するランダムPEGylationでは、多様な修飾率(PEG導入率)のPEG化wTNF- α が得られてしまうが、その中から1分子のPEG導入体(ランダムモノPEG化wTNF- α ; ran-PEG-TNF- α)の収率は20%程度に過ぎない。このran-PEG-TNF- α の残存活性を検討したところ、わずか1分子のPEGの導入によりwTNF- α の約10%にまで比活性が減少していた(Fig. 3)。一方で、N末端側の8個のアミノ酸を欠損させてもTNF- α の活性は損なわれないことから、活性発現にN末端側は重要でないものと考えられている。⁹⁾ そのため、N末端アミノ基に対する部位特異的モノPEG化リジン欠損TNF- α (sp-PEG-mTNF- α)は80%以上の活性を保持しているなど、圧倒的な利点を有していることが判明した(Fig. 1)。この分子的均一性や比活性、収率に優れた部位特異的PEG化リジン欠損TNF- α は、血中滞留性や抗腫瘍作用の選択的発現能に優れているうえ、従来法で作製したランダムPEG化TNF- α よりも著しく強い*in vivo*抗腫瘍効果を有し

ていることも見出しており、現在臨床応用に向けた研究を推進中である。一方、N末端領域が活性発現に必須である蛋白質の場合でも、機能性リジン欠損体を創製したうえで、活性発現とは無関係な領域に新たなリジン残基を挿入することにより、 α アミノ基と ϵ アミノ基との反応性の違いを利用した部位特異的バイオコンジュゲーションが可能となることも判明している。以上の革新的な部位特異的バイオコンジュゲーション法は、本研究で確立した「機能性人工蛋白質の分子進化戦略」との融合により機能性リジン欠損体を創製することによって初めて可能となる。現在、種々の蛋白質に関して、活性を十二分に保持したリジン欠損体創出を進めており、今後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の有用性をさらに追求していく予定である。

5. DDS機能を有した機能化高分子キャリアの設計

従来より、バイオコンジュゲート化蛋白質の生体内挙動や*in vivo*薬効発現強度が、蛋白質表面を覆う修飾高分子の諸性質によって運命付けられることに着目し、バイオコンジュゲーション法のさらなるグレードアップを目的に、薬物徐放化能や標的指向能といったDDS機能を有する高分子キャリアの分子設計を図ってきた。例えば、血中滞留性の向上を目的としたバイオコンジュゲーションにはPEGよりもポリビニルピロリドン(PVP)が圧倒的に優れた修飾高分子であること、新規合成したマレイン酸導入PVPやラウリル酸導入PVPがそれぞれIFN- γ 誘導能(抗腫瘍免疫誘導能)や高度な脾臓指向能を有していることなどを明らかにしてきた。²⁹⁾ これら新規修飾高分子を用いたバイオコンジュゲーションは、単に蛋白質の生体内安定性を高めるだけでなく、高度な組織ターゲティング能や新たな薬理活性を導入することにより、生理活性蛋白質の目的とする治療作用の選択的発現をさらに保証することを認めている。このような一連の研究を通じて最近、腎臓への高度な薬物送達能とpH応答性薬物徐放化能を併せ持った高分子キャリア[Poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride); PVD]を新規合成することに成功した。⁴⁾ このPVDは、pH8以上で蛋白質のアミノ基と結合し、pH7以下で結合蛋白質を徐々に解離する。一般に炎症組織や

癌組織では正常組織よりも低 pH であることから、PVD を薬物キャリアとして適用した場合、病態組織でのみ効果的に蛋白質が pH 応答的に徐放されることを意味している。この PVD をマウスに尾静脈内投与したところ、数時間後に投与量の約 80% が腎臓へ選択的に集積し、4 日後には 40% に減少していた (Fig. 7)。この PVD は腎尿細管上皮細胞へのみ選択的に取り込まれるが、細胞毒性を全く示さない。大量投与しても腎臓を含め他の組織に何ら傷害を及ぼさない。さらに PVD でバイオコンジュゲーションした抗炎症蛋白質 (SOD) は生体内安定性に優れ、かつ静脈内投与後、選択的に腎臓へ高集積し、著しい腎炎治療作用を発揮することを見出した。高齢化社会を迎え、腎不全を初めとする腎疾患が世界的に深刻な社会問題となっている。³⁸⁾ しかし慢性腎疾患に対する治療は、腎移植と透析に頼らざるを得ないのが現状であり、患者の QOL (Quality of Life) の観点からも、安全かつ有効な薬物療法の確立が待望されている。³⁹⁾ 本観点から現在、上述した「医薬価値に優れた機能性人工蛋白質を迅速創製できる蛋白質分子進化戦略」による機能性人工蛋白質の創製や部位特異的バイオコンジュゲーション

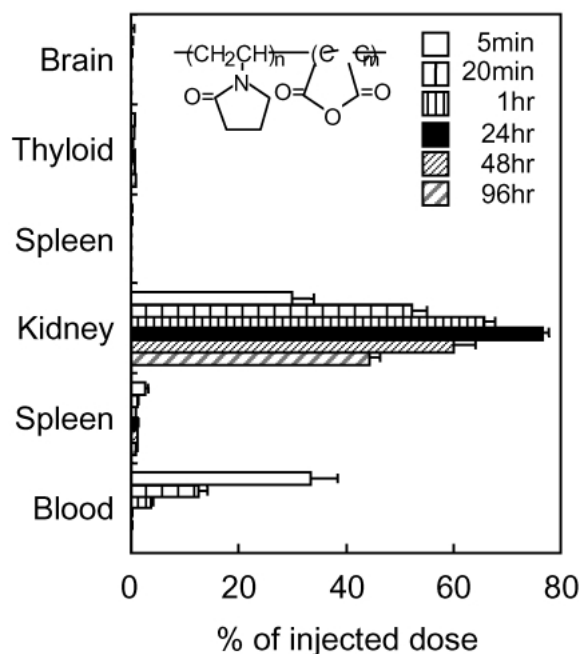


Fig. 7. Tissue Distribution of Poly (VP-co-DMMAAn); PVD after *i.v.* Injection

¹²⁵I-labelled PVD was injected into the tail vein of BALB/c mice and tissues were collected over different periods of time post-injection (from 5 mins to 96 hrs) and the radioactivity measured by γ -counter. Each point represents the mean \pm S.D.

システムとの融合により、新たな腎疾患治療戦略の確立をさらに推進している。

6. おわりに

本稿で紹介した3段階の「プロテオーム創薬に叶う DDS 基盤テクノロジー」は、プロテオーム創薬の実現に向けて、相乗的に機能するものと期待している。一方で最近、Gene shuffling⁴⁰⁾ や人工遺伝暗号システム⁴¹⁾などを用いた機能性人工蛋白質の創出に注目が集まっている。これら興味深いアプローチは天然に存在しない新たなアミノ酸配列を有した人工蛋白質を作製しようとするものであるが、残念ながら臨床応用可能な非天然型生理活性蛋白質の創製には至っていない。当然のことながら、本研究で確立した DDS 基盤テクノロジーはこれら非天然型生理活性蛋白質の探索や創製、安定化や高機能化にも適用可能であり、現在 Gene shuffling 法とファージ表面提示法を融合した新たな機能性人工蛋白質の創出システムの構築を進めている。

また前述したように疾患プロテオミクス情報を有効活用したプロテオーム創薬を推進するためにはまず、多種多様な蛋白質とその構造変異体を網羅的に作製し、これらのレセプター・リガンド結合の様式・強度などをも含めた機能情報をハイスループットに評価可能な方法論の構築と、その立体構造との連関を網羅的に評価することが必須となる。そのうえで、ゲノムシーケンス情報を基に新たに見出された蛋白性シーズなどの機能と構造を予測し得るバイオインフォマティクスが構築されて、ようやく真の意味でプロテオーム創薬が可能となってくる。この点、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を迅速創製できる蛋白質的分子進化戦略」は、膨大な多様性を持った構造変異体を創出し、その機能解析を迅速に大量解析し得る最適の基盤テクノロジーとなり得る。以上の研究成果は、得られた数多くの機能性人工蛋白質の立体構造と機能特性との連関評価を通じて、「機能 (医薬価値) → 構造」に関する知見の集積が可能となり、将来的に機能性人工蛋白質を合理的設計し得る「プロテオーム創薬のためのバイオインフォマティクス」の構築にも貢献し得るものと期待される。

謝辞 筆者が平成 16 年度日本薬学会奨励賞を受賞できたのは、ひとえに神戸学院大学学長・

大阪大学名誉教授の恩師 真弓忠範先生のご懇篤なるご指導, ご鞭撻の賜であり, 心から厚く御礼を申し上げます. また本総説で示した筆者のこれまでの研究は, 主として大阪大学薬学研究科助教授, 中川晋作先生をはじめとする大阪大学薬学研究科薬剤学分野の皆様にご協力を頂きました. この場をお借りして感謝申し上げます. 最後になりましたが, 本研究は文部科学省科学研究費, 厚生労働省科学研究費に加え, ヒューマンサイエンス振興財団や武田科学振興財団, 千里ライフサイエンス振興財団のご援助を賜りました. ここに御礼を申し上げます.

REFERENCES AND NOTES

- 1) Present address: National Institute of Health Sciences, Osaka Branch Fundamental Research Laboratories for Development of Medicine, 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki 567-0085, Japan.
- 2) Yamamoto Y., Tsutsumi Y., Yoshioka Y., Nishibata T., Kobayashi K., Okamoto T., Mukai Y., Shimizu T., Nakagawa S., Nagata S., Mayumi T., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 546-552 (2003).
- 3) Tsutsumi Y., Onda M., Nagata S., Lee B., Kreitman R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8548-8553 (2000).
- 4) Kamada H., Tsutsumi Y., Sato-Kamada K., Yamamoto Y., Yoshioka Y., Okamoto T., Nakagawa S., Nagata S., *Nat. Biotechnol.*, **21**, 399-404 (2003).
- 5) Onda M., Nagata S., Tsutsumi Y., Vincent J. J., Wang Q., Kreitman R. J., Lee B., *Cancer Res.*, **61**, 5070-5077 (2001).
- 6) Smith G. P., *Science*, **228**, 1315-1317 (1985).
- 7) Oettgen H. F., Carswell E. A., Kassel R. L., Fiore N., Williamson B., Hoffmann M. K., Haranaka K., *Recent Results Cancer Res.*, **75**, 207-212 (1980).
- 8) Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D. V., *J. Biol. Chem.*, **260**, 2345-2354 (1985).
- 9) Jones E. Y., Stuart D. I., *Nature*, **338**, 225-228 (1989).
- 10) Old L. J., *Science*, **230**, 630-632 (1985).
- 11) Sugarman B. J., Aggarwal B. B., Hass P. E., Figari I. S., Palladino Jr. M. A., Shepard H. M., *Science*, **230**, 943-945 (1985).
- 12) Creaven P. J., Brenner D. E., Cowens J. W., Huben R. P., Wolf R. M., Takita H., Arbuck S. G., Razack M. S., Proefrock A. D., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **23**, 186-191 (1989).
- 13) Chapman P. B., Lester T. J., Casper E. S., Gabrilove J. L., Wong G. Y., Kempin S. J., Gold P. J., Welt S., Warren R. S., Starnes H. F., *J. Clin. Oncol.*, **5**, 1942-1951 (1987).
- 14) Kimura K., Taguchi T., Urushizaki I., Ohno R., Abe O., Furue H., Hattori T., Ichihashi H., Inoguchi K., Majima H., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **20**, 223-229 (1987).
- 15) Spriggs D. R., Sherman M. L., Michie H., Arthur K. A., Imamura K., Wilmore D., Frei E. 3rd, Kufe D. W., *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 1039-1044 (1988).
- 16) Yoshida J., Wakabayashi T., Mizuno M., Sugita K., Yoshida T., Hori S., Mori T., Sato T., Karashima A., Kurisu K., *J. Neurosurg.*, **77**, 78-83 (1992).
- 17) Taguchi T., *Gan To Kagaku Ryoho*, **13**, 3491-3497 (1986).
- 18) Eggermont A. M., Schraffordt Koops H., Lienard D., Kroon B. B., van Geel A. N., Hoekstra H. J., Lejeune F. J., *J. Clin. Oncol.*, **14**, 2653-2665 (1996).
- 19) Halme M., Maasilta P., Repo H., Leirisalo-Repo M., Taskinen E., Mattson K., Cantell K., *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, **15**, 283-291 (1994).
- 20) Anasetti C., Hansen J. A., Waldmann T. A., Appelbaum F. R., Davis J., Deeg H. J., Doney K., Martin P. J., Nash R., Storb R., *Blood*, **84**, 1320-1327 (1994).
- 21) Vaglini M., Belli F., Santinami M., Arienti F., Parmiani G., Persiani L., Santoro N., Grazia Inglese M., D'Elia F., Cascinelli N., *Ann. Surg. Oncol.*, **2**, 61-70 (1995).
- 22) Debs R. J., Fuchs H. J., Philip R., Brunette E. N., Duzgunes N., Shellito J. E., Liggitt D., Patton J. R., *Cancer Res.*, **50**, 375-380 (1990).
- 23) Okada N., Kaneda Y., Miyamoto H., Yamamoto Y., Mizuguchi H., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 831-836 (1996).
- 24) Utoguchi N., Mizuguchi H., Saeki K., Ikeda K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T.,

- Cancer Lett.*, **89**, 7–14 (1995).
- 25) Utoguchi N., Mizuguchi H., Dantakean A., Makimoto H., Wakai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **73**, 24–28 (1996).
- 26) Kayton M. L., Libutti S. K., *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2**, 136–138 (2001).
- 27) Gaskill H. V. 3rd, *J. Surg. Res.*, **44**, 664–671 (1988).
- 28) Tsan M. F., White J. E., Santana T. A., Lee C. Y., *J. Appl. Physiol.*, **68**, 1211–1219 (1990).
- 29) Kamada H., Tsutsumi Y., Yamamoto Y., Kihira T., Kaneda Y., Mu Y., Kodaira H., Tsunoda S. I., Nakagawa S., Mayumi T., *Cancer Res.*, **60**, 6416–6420 (2000).
- 30) Kaneda Y., Yamamoto Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Hirano T., Mayumi T., *Cancer Res.*, **58**, 290–295 (1998).
- 31) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kamada H., Kihira T., Kaneda Y., Ohsugi Y., Mayumi T. *Thromb. Haemost.*, **77**, 168–173 (1997).
- 32) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kanamori T., Nakagawa S., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **71**, 963–968 (1995).
- 33) Tsutsumi Y., Tsunoda S., Kamada H., Kihira T., Nakagawa S., Kaneda Y., Kanamori T., Mayumi T., *Br. J. Cancer*, **74**, 1090–1095 (1996).
- 34) Tsutsumi Y., Kihira T., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Kaneda Y., Kanamori T., Mayumi T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **278**, 1006–1011 (1996).
- 35) Yamagishi J., Kawashima H., Matsuo N., Ohue M., Yamayoshi M., Fukui T., Kotani H., Furuta R., Nakano K., Yamada M., *Protein Eng.*, **3**, 713–719 (1990).
- 36) Van Ostade X., Tavernier J., Prange T., Fiers W., *EMBO J.*, **10**, 827–836 (1991).
- 37) Loetscher H., Stueber D., Banner D., Mackay F., Lesslauer W., *J. Biol. Chem.*, **268**, 26350–26357 (1993).
- 38) 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.*, **32**, 992–999 (1998).
- 39) Progress and Priorities: Renal disease research plan. Report of the strategic planning conferences—Renal research properties—sponsored by National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease, Council of American Kidney Societies, (December 5–6, 1998 & February 4–5, 1999).
- 40) Chang C. C., Chen T. T., Cox B. W., Dawes G. N., Stemmer W. P., Punnonen J., Patten P. A., *Nat. Biotechnol.*, **17**, 793–797 (1999).
- 41) Hirao I., Ohtsuki T., Fujiwara T., Mitsui T., Yokogawa T., Okuni T., Nakayama H., Takio K., Yabuki T., Kigawa T., Kodama K., Nishikawa K., Yokoyama S., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 177–182 (2002).