

Development of novel nanosystem-based approaches toward the medical applications of proteins

唐, 蘅敏

<https://hdl.handle.net/2324/1806848>

出版情報：九州大学, 2016, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 唐 蘅敏

論 文 名 : Development of novel nanosystem-based approaches toward
the medical applications of proteins
(新規ナノシステムの設計に基づく医療応用に向けたタンパク質活用法
の開発)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質製剤は、生体由来のタンパク質、もしくはバイオテクノロジーを利用して製造した天然物に限りなく類似させたタンパク質を医薬品として利用したものを指す。これまでに、インスリンなどをはじめとするヒト型のホルモンや、サイトカイン、成長因子、血液成分、酵素、ワクチン類、モノクローナル抗体などがタンパク質製剤として開発・販売されている。現在、タンパク質製剤を含むバイオ医薬品の市場は2002年の4000億円弱であったのが、2012年には1兆円に近付きつつある。これは、タンパク質製剤が従来の低分子医薬品と比べて、より高い薬効および標的に対してより高い特異性を有するために、新薬の開発が盛んに行われてきたためである。しかし、その一方で、タンパク質は大きな分子サイズおよび複雑な構造を有するために、消化システムでの吸収が低く、周囲の環境に敏感かつ血中での滞留性が低いなどといった欠点を有している。そのため、より優れた生体適合性および薬物動態を付与するために、様々なタンパク質送達に関する研究が行われてきた。

第1章ではタンパク質製剤に関する簡単な説明、および、これまでに開発されたユニークなタンパク質送達法に関する研究をまとめている。また、本研究の位置づけを先行研究と関連付けて説明している。

第2章ではタンパク質の新規経皮送達システムの開発に関する研究をまとめた。経皮薬物送達法は、薬物の消化管における分解を回避できるため、機能を維持したまま経皮ワクチン抗原やインシュリンなどのタンパク質の直接投与に向いている。しかし、皮膚表面の疎水的な角質層がバリアとなり、親水性タンパク質の皮膚透過は容易ではない。そこで角質層の透過性向上のための方法の一つとして熱刺激に注目し、特に近赤外光を吸収し、効率よく熱に変換できる金ナノロッド (GNR) を用いることによるタンパク質の経皮吸収効率の向上に取り組んだ。また、持続的な加熱は、皮膚組織全体へのダメージとなり得るため、適切な照射条件の検討が必要である。一方、適度な加熱は免疫応答の活性化にもつながることが期待される。これらをふまえて、照射モードを適切に選択することによる治療目的 (経皮ワクチンもしくはインシュリン投与) に応じたタンパク質の経皮投与の可能性について検討した。その結果、連続波 (CW) レーザーを用いた場合には、モデルタンパク質であるオブアルブミン (OVA) の皮内浸透が促進されると同時に、ほどよい持続的な皮膚組織の加熱によって抗原提示時に分子シャペロンとして働く HSP70 の発現が誘導されることを見出し、経

皮ワクチンを目的とするならばこの CW レーザー照射が有効である。一方、パルスレーザーを用いた場合には、HSP70 の発現は認められず、OVA の浸透のみが促進されることを見出した。以上に基づき、インシュリンなどの血流への移行が薬効に直結するタンパク質を投与する場合にはパルスレーザーが好ましいと考えられる。

第 3 章では、生体由来の酵素を効果的に用いる戦略に基づく新たな治療法の提案を行った。具体的には、疾患の原因物質を酵素で分解・除去する生体解毒療法に注目した。酵素は、優れた触媒効率および基質特異性を有しているが、温度や pH、さらにはプロテアーゼによる分解などによって容易に失活する。そのため、酵素を保持し送達するキャリアには、①酵素の活性を維持したまま担持できる、②物質透過性の制御が可能、といった性質を有することが求められる。ここでは、水中にて容易に形成でき、基質は透過するが酵素を分解しうるプロテアーゼなどの高分子物質は透過させない半透性膜で構成されるポリイオンコンプレックス (PIC) 型ポリマーベシクル (PICsome) に注目した。この PICsome に酵素を封入すれば、酵素を保護しながら病因物質などの基質と反応させるため、PICsome に病因物質分解酵素を封入したナノリアクターを作製するとともに、酵素活性の維持が可能かどうかを検証した。具体的にはヒスタミンを基質とし、その分解酵素であるジアミンオキシダーゼ (DAO) を PICsome に封入することで DAO@PICsome を作製し、病態モデルを用いた細胞実験および動物実験においてナノリアクターとしての有用性を評価した。その結果、DAO@PICsome は DAO 単体に比べより過酷な条件での活性維持が可能であることが示され、PICsome が酵素担持キャリアとして好適であり、DAO@PICsome が生体解毒用リアクターとして有用であると示唆された。

第 4 章では、第 3 章で作製した酵素リアクターの長期的な機能維持を目指して検討を行った。酵素反応を生体外で利用する場合、利用環境が細胞内に代表される生理環境とは全く異なるためにその性質や挙動が変化する可能性がある。より具体的には、細胞内環境が様々なタンパク質が多量に存在する濃厚系であること、また、細胞内がナノ～サブミクロンサイズに区画化 (コンパートメント化) されていることなどが重要な因子となりえる。前者は分子クラウディング、後者はコンファインメント効果と呼ばれ、それぞれ酵素活性やその安定性に影響を及ぼす。これらのことから、特に酵素を用いたリアクターの場合、これら細胞内に見られる特徴的な環境を人工的なナノリアクターの設計に取り入れることでその性能の向上が期待できる。ここでは、より高性能な酵素リアクターの創製を目指して細胞内環境を模倣した酵素内包 PICsome を作製し、その酵素活性を評価した。具体的には、モデル酵素である β -ガラクトシダーゼ (β -gal) を 100 nm スケールの PICsome に内包することでコンパートメント化するとともに、クラウディング効果をもたらすデキストランを内包させ、得られたナノリアクターの活性や安定性を評価している。その結果、37 °C 保存において、コンパートメント化した β -gal の活性がフリーのものと比較してより長期間維持されること、及び、デキストランを共存させることで、-20 °C において、酵素の活性を保つことが可能であること、などを見出している。同時に、より酵素に対して低侵襲な PICsome 封入法の検討も進めており、作製時に酵素溶液を添加するタイミングや原料溶液の混合手法と活性の相関を明らかにした。

第 5 章では、本論文の総括を行うとともに、各章で得られた知見に基づく展望を述べた。