S2-08

糖鎖認識に基づく Receptor-mediated Endocytosis を利用した細胞特異的ターゲティング

京大・薬 ○西川元也、高倉喜信、橋田 充

CELL-SPECIFIC TARGETING OF DRUGS BY RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS BASED ON SUGAR RECOGNITION SYSTEMS

Makiya NISHIKAWA, Yoshinobu TAKAKURA
and Mitsuru HASHIDA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

【目的】分子構造修飾による薬物の体内挙動制御は、薬物治療における有効性の向上あるいは毒性の軽減のための有用なアプローチと考えられる。中でも標的部位に高い親和性を有する生物学的認識素子を利用して臓器あるいは細胞特異的な薬物送達を達成する手法は有用性が高いものと思われる。こうした目的に利用可能な特異性の高い生物学的認識現象の代表的な例として、肝臓の実質細胞や種々のマクロファージが有する糖鎖認識に基づく receptor-mediated endocytosis があげられ、この機構を利用して細胞内へ薬物を送り込むアプローチが大きな注目を集めている。しかしながら、体内動態解析あるいは制御の立場よりこうした機構を系統的に検討した研究はほとんど存在しない。そこで本研究では、タンパク質医薬品に直接糖分子を導入することによるターゲティングの実現および低分子薬物のための新規糖修飾高分子キャリアーの開発の2点を目的に、薬物速度論の立場より種々の糖修飾高分子の体内挙動を検討した。さらに得られた結果に基づき、治療への応用の可能性を検討した。

【実験方法】1.糖修飾高分子および薬物結合体の合成：タンパク質医薬品に関して一般的な情報を得るため5種類の分子量の異なるタンパク質、すなわち bovine γ -globulins (IgG: MW = 150 kDa)、bovine serum albumin (BSA: MW = 67 kDa)、superoxide dismutase (SOD: MW = 32 kDa)、soybean trypsin inhibitor (STI: MW = 20 kDa) および chicken egg white lysozyme (LZM: MW = 14 kDa) を選び、Lee らの方法に準じて galactose 結合体 (Gal-IgG、Gal-BSA、Gal-SOD、Gal-STI、Gal-LZM) および mannose 結合体 (Man-BSA、Man-SOD) を合成した (Table I)。また、低分子薬物のキャリアーとして、糖修飾タンパク質などと比べて抗原性が低く一般性の高いキャリアー

TABLE I Physicochemical properties of glycosylated proteins used in this study

Compounds	Apparent ^{a)} molecular weight	Modified ^{b)} NH ₂ -groups (%)	Number of ^{c)} sugar residues (mol/mol protein)	Sugar ^{c)} content (%)
Gal-IgG	159000	69.0	38.4	4.40
Gal-BSA	68500	73.4	21.5	5.71
Gal-SOD	33600	79.9	14.2	7.68
Gal-STI	21300	78.9	6.03	5.12
Gal-LZM	15200	72.9	4.82	6.03
Man-BSA	n.d.	73.7	15.8	4.20

a) The apparent molecular weights of glycosylated proteins were determined by HPLC gel filtration chromatography.

b) The modified NH₂-groups were determined by TNBS method.

c) The number of sugar residues and sugar content were determined by anthrone-sulfuric acid method.

Fig. 1 A representative chemical structure of araC conjugated to galactosylated carboxymethyl-dextran (Gal-CMD)

Fig. 1 A representative chemical structure of araC conjugated to galactosylated carboxymethyl-dextran (Gal-CMD)

2. 各種誘導体の放射標識：代謝、分解の影響を最小限に抑え体内挙動を正確に評価するため、タンパク質およびその誘導体は ^{111}In 標識体を、dextran 誘導体は ^{14}C 標識体を用いた^{2,3)}。araC 結合体は ^3H araC を用いた放射標識体により体内挙動を検討した。

3. in vivo 静注実験：各標識体を、ddY 雄性マウスの尾静脈内に種々の投与量で投与後、経時的に屠殺し、血漿中、尿中、および臓器中の放射活性を測定した。血漿中濃度のデータにより、血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) および全身クリアランスを算出し、各臓器中濃度、尿中への累積排泄量から臓器への取り込みクリアランスおよび尿排泄クリアランスを求めた。また肝臓をコラゲナーゼ灌流により実質細胞と非実質細胞とに分離し、誘導体の肝内細胞分布を調べた。

4. 生理学的モデルに基づく速度論解析：糖修飾タンパク質の肝臓への取り込み挙動をより詳細に解析するため Fig. 2 に示すモデルを構築した。各パラメータの算出は、MULTI(RUNGE)⁴⁾ を用いて実験データにモデル式を当てはめることにより行った。

5. ラット肝障害モデルに対する SOD 誘導体の障害抑制効果：虚血に引き続く再灌流により作成した肝障害ラットに、SOD およびその誘導体を 10,000 units/kg (約 3~6 mg/kg) の投与量で投与し、静脈内投与した bromosulfophthalein (BSP) の胆汁排泄パターンを指標に障害抑制

の開発を目的として、平均分子量約 70 kDa の dextran の負電荷誘導体 carboxymethyl-dextran (CMD) を合成し、amino 基を導入後、上記方法により galactose 結合体 (Gal-CMD) および mannose 結合体 (Man-CMD) を合成した。合成したキャリアーにモデル薬物として抗癌剤 cytosine β -D-arabinoside (araC) を混合酸無水物法により結合し、高分子化プロドラッグ araC-CMD、araC-Gal-CMD を合成した (Fig. 1)。

効果を評価した。

6. araC 結合体による MH134 細胞増殖抑制効果：DMEM 培地中で継代培養した細胞に、araC および araC 結合体を種々の濃度で添加し、24 時間後の生細胞数から薬物を加えない場合の増殖に対する比を算出し、増殖抑制率とした。

【結果・考察】 1. 糖修飾高分子の体内動態^{5),6)}：低投与量 (1 mg/kg 以下) において Gal-BSA は非常に速やかに血中より消失し、投与量の 80 % 以上が肝臓に蓄積した。また肝臓の細胞を分画したところ実質細胞による取り込みの寄与が大きかったことから、これらは実質細胞表面に存在するアジアロ糖タンパク質レセプターによって速やかに細胞内に取り込まれることが示唆され

Fig. 2 A physiological pharmacokinetic model for analysing the disposition of ^{111}In -labeled glycosylated proteins

た。一方、高投与量 (10、20 mg/kg) では肝臓への取り込みは遅れ、飽和現象が見られた。Man-BSA、Man-CMD の挙動も投与量に依存し、低投与量域では 70 % 以上が肝臓に移行した。また、これらが Kupffer 細胞や肝内皮細胞からなる非実質細胞により高濃度に蓄積したことから、細胞表面に存在することが知られている Mannose レセプターにより取り込まれていることが示唆された。また araC を導入することによる動態の変化は殆どなく、糖修飾 CMD により効率よく肝臓にターゲティング可能であった。生理学的モデルに基づく解析の結果、Gal-BSA は肝臓における affinity が非常に高く、またその肝固有クリアランスも肝血流と比較して非常に大きく、肝取り込みは血流律速となっていることが明らかとなった。これに対し、Man-BSA は肝臓に対する affinity が幾分低く、これが Gal-BSA と比べて低い肝取り込みクリアランスの原因であることが示された。

2. 肝臓へのターゲティング効率に及ぼすタンパク質の分子量の影響 (Fig. 3) : Gal-IgG、Gal-SOD の血中からの消失や肝取り込みのパターンはほぼ Gal-BSA と同様の投与量依存的な挙動を示し、SOD よりもサイズの大きいタンパク質については効率よくターゲティング可能であることが確認されたが、Gal-SOD は投与量が 10 mg/kg 以上となると肝移行量が Gal-IgG や Gal-BSA と比較して低くなり、肝臓の取り込み機構が飽和したときには糸球体濾過に代表される肝臓以外への消失速度が大きいことが肝臓へのターゲティング効率を低下させる要因となることが明らかとなった。さらにサイズの小さい Gal-STI、Gal-LZM は、低投与量の場合にも肝臓への移行量がそれぞれ約 40、30 % と低く、Fig. 2 のモデルを用いて解析したところ、この両者のレセプターに対する affinity がかなり低く、このことが高い糸球体濾過速度とともにこれら低分子タンパク質の肝臓へのターゲティング効率を

Fig. 3 Dose dependent hepatic clearances (A) and amounts accumulated in the liver (B) of galactosylated proteins after i.v. injection in mice

低下させている要因であることが明らかにされた。以上のことから、分子量が20 kDa程度の小さいタンパク質の場合、肝指向性を高めるためには腎臓からの消失を抑制するために高分子と結合させる、あるいはレセプターへの affinity を高めるためより効率の良い multi-antenna の糖鎖を結合する必要性が示唆された。3. 肝臓虚血・再灌流により惹起される肝障害に対する SOD 誘導体の抑制効果⁷⁾：以上の検討より、SOD は分子サイズの点からみても糖修飾により肝臓にターゲティング可能であることが明らかとなったので、肝障害に対する治療の応用を試みた。未修飾 SOD、血中滞留型の SOD-PEG2、SOD-CMD、肝細胞表面にターゲティングされる SOD-DEAED と比較して、Gal-SOD、Man-SOD は高い抑制効果を示し、SOD を galactose あるいは mannose を用いて肝臓の実質細胞、非実質細胞内にターゲティングすることは薬理効果の点からも有用であることが示された。4. araC-dextran 結合体の癌化学療法への応用：araC が Gal-CMD により効率よく肝実質細胞にターゲティングできることが明らかとなったので、この結合体による癌化学療法への応用を検討した。効果の判定は、糖修飾 BSA を用いた検討から galactose を認識する機構を持つマウス腹水肝癌細胞 MH134 の in vitro での増殖抑制能により行った。araC-Gal-CMD は araC-CMD より低い濃度で同等の効果を与えたことから、こうした糖を認識素子に用いるアプローチは、ある種の癌に対する化学療法にも有用であることが示唆された。

ABSTRACT

To construct the strategy of cell-specific targeting of proteins and low-molecular weight drugs coupled to macromolecules via sugar receptor-mediated endocytosis, pharmacokinetic characteristics of macromolecules modified with galactose and mannose residues were investigated in mice. The analysis based on a physiological model revealed that galactosylation of proteins greater than superoxide dismutase (SOD: MW = 32 kDa) led them to have extremely high affinity for the carbohydrate receptor and to be effectively delivered to the liver at lower doses less than 1 mg/kg. On the other hand, galactosylated soybean trypsin inhibitor (MW = 20 kDa) and chicken egg white lysozyme (MW = 14 kDa) showed relatively lower delivery to the liver because of their low affinity due to small numbers of galactose residues and high urinary excretion rate. Based on the obtained results, pharmacological activities of galactosylated and mannosylated SOD were examined in hepatic ischemia/reperfusion injury model in rats and showed superior effects. On the other hand, carboxymethyl-dextran with galactose or mannose residues was synthesized to develop a new carrier system for hepatic targeting of low-molecular weight drugs. Cytosine β -D-arabinoside was coupled to these hepatotropic carriers and successfully targeted to the liver and cultured mouse hepatoma cell lines.

REFERENCES

1. Lee, Y.C. et al., *Biochemistry*, 15 (1976) 3956
2. Hnatowich, D.J. et al., *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 33 (1982) 327
3. Isbel, H.S. et al., *Tech. Assoc. Pulp. Paper Ind.*, 40 (1957) 739
4. Yamaoka, K. and Nakagawa, T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, 6 (1983) 595
5. Nishikawa, M. et al., *Int. J. Pharm.*, 85 (1992) 75
6. Nishikawa, M. et al., *Pharm. Res.*, 10 (1993) 1253
7. Fujita, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189 (1992) 191