

組換え型糖鎖付加アルブミンの新規肝ターゲティング担体としての有用性評価

生命薬科学専攻 医療薬学講座 (薬物動態制御学分野) 平田 憲史郎

ヒト血清アルブミン (HSA) は血漿中に最も多く存在する単純タンパク質であり、抗原性の低さや生体適合性、血中滞留性といった面で大変優れたタンパク質であるため、ドラッグデリバリーシステム (DDS) における担体としての利用が期待されてきた。一方、マンノース受容体 (MR) は肝臓の非実質細胞に局在する受容体であり、マンノースなどの糖を末端に持つ糖タンパク質等を認識することで、それらを肝臓内に取り込む。これまでに、肝ターゲティング担体の開発を目的として、マンノースを化学的に付加したアルブミンが作製され、担体としての様々な評価が行われてきた。しかしながら、化学修飾による糖付加は、修飾体の不均一性や立体構造の変化に加え、肝でのスカベンジャーレセプターへの認識が強まるといった欠点があった。そこで本研究では、MR を標的とした新規の肝ターゲティング担体の作製を目的として、*Pichia* 酵母を宿主として遺伝子組換え型マンノース修飾 HSA (Man-rHSA) を作製し、その DDS 担体としての機能評価を行った。以下に今回得られた知見を要約する。

1. 組換え型糖鎖付加ヒト血清アルブミンの作製とその構造及び体内動態特性の評価

天然に存在する糖鎖付加型 HSA バリエーションの遺伝子配列情報を基に、部位特異的変異法を用いて HSA の cDNA に N-結合型糖鎖のコンセンサス配列を導入し、*Pichia* 酵母を宿主とした発現系により Man-rHSA の作製を試みた (D63N, A320T, D494N 及びそれらの三重変異体 (triple mutant-rHSA): TM-rHSA)。SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS 解析の結果、作製した Man-rHSA のうち、D63N 及び A320T については糖の付加数が 1~3 個であったのに対し、D494N 及び TM-rHSA には各々 13~14 個のマンノース及び N-アセチルグルコサミンが付加していることが示唆された。また、蛍光、CD スペクトル及びキャピラリー電気泳動など各種分光学的手法による解析の結果、Man-rHSA は野生型の HSA (wt-rHSA) と非常に類似した構造を有していることが示唆された。さらに、マウスを用いた ¹¹¹In 標識体の体内動態解析の結果、D63N と A320T は wt-rHSA と類似した血中濃度推移や肝移行性を示したのに対し、D494N と TM-rHSA は wt-rHSA に比べて、より速やかな血中からの消失に伴い、高い肝移行性と高い肝取り込みクリアランス値を示した。さらに、TM-rHSA の肝臓への移行は MR の基質として知られている過剰量のマンナン併用投与により有意に阻害を受けたことから、TM-rHSA は MR を介して肝臓へ取り込まれる可能性が示唆された。また、マウス肝臓より各種肝細胞を分離・培養後、TM-rHSA の取り込み実験を行ったところ、その 90% 以上は非実質細胞に取り込まれ、なかでも主にクッパー細胞に特異的に取り込まれることが観察された。

2. 肝虚血再灌流障害に対する一酸化窒素付加型 TM-rHSA の有用性評価

肝虚血再灌流 (IR) 障害モデルラットに対する、S-ニトロソ化 TM-rHSA (SNO-TM-rHSA) の有効性について検討を行った。S-ニトロソ化は亜硝酸イソアミルを NO ドナーとし、HSA 分子上に唯一遊離型として存在する 34 位のシステインへと付加させることで行った。このとき、NO 付加効率は約 0.5 mol/mol TM-rHSA であった。SNO-TM-rHSA の尾静脈内単回投与により血清 AST 及び ALT 値の有意な減少が観察されたことから、SNO-TM-rHSA は肝 IR 障害を抑制することが示された。また、HPLC を用いて肝臓中の NO_x 量を測定したところ、SNO-TM-rHSA 投与後の肝臓では NO_x の量が有意に増加しており、さらに Western blotting により、SNO-TM-rHSA 投与後に肝臓のヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の発現誘導が確認された。すなわち、SNO-TM-rHSA による IR 障害改善メカニズムとして、肝臓への NO の移行量増大に伴う HO-1 の発現誘導が一部関与している可能性が示唆された。

3. アセトアミノフェン誘発急性肝障害に対するチオール基高付加型 TM-rHSA の有用性評価

アセトアミノフェン (APAP) 誘発急性肝障害モデルマウスに対する、チオール (SH) 基高修飾 TM-rHSA の有効性について検討した。SH 基の修飾は、イミノチオランを用いて HSA の持つ第 1 級アミンへと付加させることで行った。このときの修飾効率は、7.5 mol/mol TM-rHSA であった。その結果、臨床で使用されている N-アセチルシステイン (NAC) の 60 分の 1 の SH 基含量で、SH-TM-rHSA (尾静脈内単回投与) は NAC 投与群 (腹腔内投与) と同程度にまで血清 AST 及び ALT 値を有意に減少させ、また、HE 染色の結果からも同様に肝組織の回復効果が観察された。特に標的となるクッパー細胞が存在する血管周辺部での効果が強く観察された。また、*in vitro* において過酸化水素に UV 照射を行い、産生するヒドロキシルラジカルを ESR を用いて測定する系において、SH-TM-rHSA はヒドロキシルラジカルの産生を顕著に抑制した。さらに、APAP 肝障害マウスにおいて、DNA 酸化産物である 8-OHdG の肝での免疫染色を行ったところ、SH-TM-rHSA はその肝蓄積を有意に抑制した。以上のことから、SH-TM-rHSA は速やかに肝臓へ移行した後、肝内で抗酸化効果を示すことで肝障害を軽減していることが示唆された。

以上、本研究では、肝クッパー細胞の MR を標的とした TM-rHSA の作製に成功した。TM-rHSA は、NO や SH 基など低分子抗酸化物質を効率的に肝臓へとデリバリーすることで肝障害を抑制する新しい肝ターゲティング担体となることが示唆された。最近、*Pichia* 酵母を宿主とした組換え型アルブミン製剤が上市されるようになり、今回作製した TM-rHSA のような、より付加価値の高いアルブミン製剤の大量生産も可能となった。今後、TM-rHSA を担体として、癌ワクチンやサイトカイン等の肝デリバリーといった応用も期待され、本研究で得られた知見が新規 DDS 担体開発のための有用な一助になるものと思われる。