

## 審査の結果の要旨

氏名 鈴木 幸吉

薬物の高い有効性、安全性を実現するために、特定臓器への薬物送達システムの開発が重要な課題であり、各種の方法が試みられている。その中で臓器特異的に薬物を送達するターゲティングベクターの開発は非常に重要なステップである。本研究では、糖を利用した新たな薬物送達システムの構築を目指し、①糖を用いた新たな臓器ターゲティングベクターを見出すこと、②臓器指向性を動態解析により特徴づけること、③ベクターの構造要件を明らかとすること、④薬物への応用に関して基礎的知見を得ること、を目的として以下の検討を行った。

### 1. 糖修飾ペプチドの特異的な腎臓取り込み

モデルペプチドとしてArg-Vasopressin(AVP)を選択し、オクタメチレン(C8)を介して各種の糖を結合させることにより糖誘導体を調製した。これら各種糖修飾体の臓器指向性を比較したところ、腎臓以外は糖修飾体間で顕著な差異は認められなかった。これに対して腎臓では明確な差異が認められ、glucose誘導体(Glc-0-C8-AVP)、mannose誘導体および2-deoxyglucose誘導体のみCLup, appが2ml/minを越え明らかな腎臓指向性を示した。Glc-0-C8-AVPの腎臓内集積部位は皮質部位の近位尿細管であることがオートラジオグラフィにより明らかとなった。さらに、in vitroでの膜画分との結合実験から、これら腎臓指向性を示した検体は腎臓の膜画分に対して結合性を示し、その特異的結合の解離定数は14から55nMであった。また、この特異的結合に対しては糖のみでは阻害効果が弱く、アルキルおよびペプチド部分が発現していることが示唆された。

腎臓指向性を示したGlc-0-C8-AVPの腎臓移行に関する動態的解析を行い以下の結果を得た。①integration plotにより腎臓取り込みクリアランス(CLup, kidney)を測定した。低用量(1nmol/kg)でのCLup, kidneyは1.7ml/minであり、抽出率は約71%と算出された。また、高用量(300nmol/kg)でのCLup, kidneyは約0.33ml/minと大きく低下し、特異的取り込み機構の存在が示唆された。②投与量を1から300nmol/kgまで増加させた場合の投与直後の全身クリアランスは低下し、その低下は腎臓CLup, appの減少で説明できた。これは、血中からの消失を担う特異的な移行機構が腎臓に存在することを示唆するものと考えられた。さらに、血中初濃度と腎臓CLup, appの関係から求めた腎移行のKm値は40から80nMと算出され、先に求めたin vitro膜画分との結合におけるKd値(55nM)と合致する値であった。③飽和投与量と考えられる300nmol/kgの非標識体投与直後では、標識体の腎臓CLup, appが低下し、時間経過と共に回復した。血漿中濃度と腎臓CLup, appの関連の解析から、この腎臓CLup, app低下は血中に残存する非標識体による競合阻害でほぼ説明できると考えられた。

以上から、特定の糖修飾AVPが特異的機構を介して腎臓に移行すること、腎

移行には腎臓膜画分上の結合が関与すること、が明らかとなった。

## 2. 糖-アルキル型腎臓指向化ベクターによるモデル薬物の腎臓指向化

薬物への応用を考えた、より単純な構造として糖-アルキル部分の検討を進めた。 $^3\text{H}$ -Glc-0-C8-AVPの腎臓膜画分への結合に対する阻害効果を検討したところ、Glc-S-C7-MeがGlc-0-C8-AVPの部分構造であるGlc-0-C7-Meより強く、リガンドとしたGlc-0-C8-AVPとほぼ同程度の強さであった。そこで、Glc-S-C7-Meの $^3\text{H}$ ラベル体で検討したところ、Kdが約16nMの特異的結合が腎臓膜画分で観察された。さらに、 $^3\text{H}$ -Glc-S-C7-Meはin vivoでも腎臓CLup, appが5ml/minと高い腎臓指向性を示した。すなわち、Glc-S-C7-Meには腎臓指向化のためのベクターとしての可能性が期待された。

そこで、幾つかのモデル薬物に対してGlc-S-C8-修飾体を調製し、その臓器分布の変化を検討した。まず、AVPの修飾体Glc-S-C8-AVPの腎臓CLup, appが3.4ml/min/gとGlc-0-C8-AVP(2.4ml/min/g)より高い腎臓指向性を示した。また、アルキル鎖長を5および11に変えたGlc-S-C5-AVPおよびGlc-S-C11-AVPについて比較したところ、前者の腎臓CLup, appは0.49ml/min/gと低い値でAVPとほぼ等しいのに対して、後者の値は4.5ml/min/gとC8誘導体より高い腎臓指向性を示した。さらに、腎臓膜画分への特異的結合がGlc-S-C8-AVP (Kd=8.6nM) およびGlc-S-C11-AVP (Kd=1.5nMおよび1700nM) には認められた。これは、腎臓認識におけるアルキル鎖長の重要性を示唆するものと考えられた。次に低分子化合物のモデルとして選択したtryptamineのオクチルチオ誘導体の腎臓CLup, appは5.72ml/min/gと非修飾体の0.63ml/min/gより顕著に高い腎臓指向性を示した。さらに、蛍光を有する低分子化合物であるNBDの糖修飾体 (Glc-S-C8-NBD) の腎臓CLup, appは3.58ml/min/gであり明らかな腎臓指向性を示した。本検体については静脈内投与後30分まで経時的に血漿中濃度および臓器中濃度の推移を検討したところ、血漿中濃度は速やかに減少し、それと共に肝臓、肺、心臓、脾臓中濃度は速やかに減少したのに対して腎臓中濃度は比較的高値を保った。本検体は腎臓に移行した後、intactな形で比較的長時間にわたって滞留すると考えられた。

なお、 $^3\text{H}$ -Glc-S-C7-Meと腎臓膜画分との特異的結合に対し、これらの腎臓移行性を示した誘導体は強い阻害効果を示した。この結果から、これらの誘導体は腎臓膜画分上に存在する同様な認識機構により腎臓に移行していると考えられた。

以上から、Glc-S-C7-Meは腎臓指向化ベクター候補となりうると考えられた。

## 3. 糖-アルキル腎臓指向化ベクターの構造要求性

Glc-S-C7-Meをリガンド候補として考え、 $^3\text{H}$ -Glc-S-C7-Meと腎臓膜画分との結合に対する糖および糖誘導体の阻害効果を指標にして腎臓に認識される構造要件の推定を試みた。その結果、mannoseおよび2-deoxyglucoseのオクチルチオ誘導体はGlc-S-C7-Meと同程度の阻害を示したのに対して、galactose、taloseおよび4-deoxyglucose誘導体は1/100以下の弱い阻害効果しか示さなかった。したがって、糖部分について、ピラノース環の2位水酸基の方向はどちらでも、あるいは無くてもよいこと、4位equatorial水酸基が必要なこと、が明らかと

なった。この結果は、先のAVPの糖修飾体の結果と合致するものであった。

さらに、Glc-S-C7-Meのアルキル部分を変化させた検体での阻害効果を検討した。その結果、アルキル部分の長さおよび分岐が認識に影響すること、アルキル以外に芳香環を有する構造でも認識されること、グリコシド結合原子付近の電子的環境が認識に大きく影響すること、グリコシド結合原子は $S>NH>O$ の順に認識性が高いこと、が明らかとなった。

以上により、糖-アルキル型腎臓認識素子の構造要件としては、糖 (glucose、mannoseおよび2-deoxyglucose) と疎水性基 (アルキルまたは芳香環) のグリコシド結合原子 ( $S>NH>O$ ) を介した構造として推定された。

以上により本研究では、モデルペプチド (AVP) の各種糖修飾体の検討から、特定の糖修飾ペプチドが高い腎臓指向性を有することを見出し、その動態解析を進めて腎臓における特異的な移行機構の存在を明らかにした。この腎臓への特異的な移行は主に近位尿細管への移行であり、腎臓膜面分上の認識分子が関与することが示唆された。さらに、腎臓膜面分への結合性の解析から、より単純な構造のGlc-S-C7-Meが腎臓指向性を有すること、さらに複数の化合物に腎臓指向性を付与できることから、腎臓指向化のための新しいターゲティング用ベクターとしての可能性を示した。また、腎臓に認識されるための構造要件を検討し、特に糖部分の4位equatorial水酸基が必須であることが示された。これらの知見は、臓器ターゲティングにおいて有用なものであり、今後糖による新たな腎臓指向化の方法論となる可能性を示すものであることから、博士(薬学)の学位を授与するのに値するものと認めた。