

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590218

研究課題名(和文) バイオ医薬品取り込みモデルの構築と分子機構解明

研究課題名(英文) Uptake mechanisms study and molecular analysis of biomedicine in tissue culture system.

研究代表者

鈴木 俊宏 (Suzuki, Toshihiro)

明治薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：80322527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ医薬品の取り込み機構をin vitroで評価することを目標とし、正常組織由来の培養細胞に対して α -ガラクトシダーゼ(GLA)の取り込みに関する検討を行い、従来から知られているGLAの取り込み機構であるマンノース6リン酸レセプターを介さない機構が存在することを見いだした。また、由来組織依存的な取り込み特性が認められたことから、本培養系が臓器ごとのバイオ医薬品の取り込みを推測する評価に応用できると思われる。

研究成果の概要(英文)：To estimate uptake mechanism of biomedicine such as alpha-galactosidase (GLA), we developed the evaluation system of uptake analysis system using in vitro primary culture cell. We proved GLA uptake dependent mannose-6-phosphate receptor (M6PR) in primary cultured cell. However, M6PR independent uptake was obtained in renal proximal tubule epithelial cells and renal cortical epithelial cells. These results correlate with in vivo pharmacokinetics. These results suggest that our cell culture system is useful for pharmacokinetic study in pre-clinical.

研究分野：細胞生物学

キーワード：酵素補充療法 マンノース6リン酸レセプター バイオ医薬品 薬物動態

1. 研究開始当初の背景

遺伝的にリソソーム酵素が欠損した疾患群(リソソーム病)の中でも、発生頻度が高く臨床的に重要な疾患であるファブリー病では、 α -ガラクトシダーゼ(GLA)の欠損により、全身の様々な臓器にGLAの基質であるGb3が分解されずに蓄積してしまう。特に腎臓などにおけるGb3の蓄積はその機能を傷害し、患者の全身状態を悪化、最終的には死に至らしめる。その根本的療法として、欠損している酵素の補充、すなわち酵素補充療法(ERT)があり、効果を上げている。

ERTでは細胞工学的に生産されたGLAが血中に投与されることで各臓器に分布し、その内在性基質であるGb3を分解することで機能を発揮する。しかしながら、その臓器移行性は均一ではなく、肝臓にはかなり取り込まれるものの、腎臓へは移行性が悪い。

腎臓におけるGb3の蓄積は、腎不全を惹起するため、患者の予後やQOLを著しく左右し、血中から腎臓へ酵素移行性の改善は治療効果の向上のために急務である。

これまでの研究から、これら酵素製剤の取り込みには主としてマンノース-6-リン酸レセプター(M6PR)が関与していることが知られており、取り込み効率の向上を目的としてマンノース-6-リン酸(M6P)を付加する改変酵素の検討などがなされ、一定の効果をあげてきている。しかしながら、当教室の基礎検討からある種の腎臓由来細胞株では、M6PRの発現が低いにも関わらず、酵素取り込み効率が低いこと、すなわちM6PR非依存的取り込みを有することが明らかとなった。

そこで、本研究では、臓器移行性、特に腎臓での酵素取り込み効率の改善を目指すために、酵素製剤の各種臓器への取り込みを評価しうる*in vitro*評価系の構築、既知の酵素取り込み機構であるM6PRを介した取り込み機構の詳細化を行うこととした。

近年、酵素のようなバイオ医薬品の開発が急速に進行しており、ジェネリックに相当するバイオシミラーや、より機能を強化した改変酵素の開発、さらに抗体医薬等、生物学的製剤の普及が進んでいる。よって、*in vitro*での評価系の構築は、今後の生物医薬品開発における評価や、品質管理等に重要になると期待される。

2. 研究の目的

遺伝的にリソソーム酵素が欠損した疾患であるリソソーム病の根本的治療として、欠損した酵素を補うERTが普及している。しかしながら、その効果は限局的であり、特に腎臓における血中からの酵素移行性の改善が治療効果の向上のために強く求められている。本研究では、バイオ医薬品取り込みの評価を目的として、本疾患で実際の治療に用いられているGLA製剤をモデルとした。これら酵素製剤の各種臓器での取り込みを評価しうる*in vitro*

評価系の構築を行い、GLAの既知の取り込み機構であるマンノース6リン酸レセプター(M6PR)を介した取り込み機構の詳細化、さらにM6PR非依存的な新規酵素取り込み機構の分子レベルでの探索をすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常組織由来細胞の培養

ヒト正常組織由来細胞は、Lonza社及び、ScienCell Research Laboratories社より購入し、検討を行った。細胞種としては、繊維芽細胞、微小血管内皮細胞、心筋細胞、腎皮質上皮細胞、尿細管上皮細胞、血管内皮由来細胞を用いた。これらの細胞はそれぞれ専用の培地、添加因子等を用いて培養し、取り込み実験、レセプター発現実験等に用いた。

(2) M6PRタンパク質発現レベルの検討

ERTに用いられる組替え酵素の主たる取り込み因子とされているM6PRの発現レベルは、ウエスタンブロット法を用いて解析を行った。また、ヒト正常組織におけるM6PRの発現レベルは正常組織由来RNAを購入し、リアルタイムRT-PCR法を用いた。

(3) GLAの取り込みの検討

取り込み酵素のモデルとしてGLAの取り込みについて、蛍光基質を用いた酵素活性測定法を用いて解析を行った。

これら正常組織由来細胞は、培養にそれぞれ特異的な培地、添加因子を要求するが、取り込み実験の際に、培地や増殖因子などにより取り込みに差が認められたため、培養条件をなるべく統一化して取り込みに影響を及ぼすカウンターイオン等の影響を排除した均質な取り込み評価系を構築した。

(4) M6PR非依存的酵素取り込み機構の解析
補充酵素の主たる取り込み機構とされているM6PR以外に、取り込みに関与する分子の存在を明らかにするために、M6P添加による基質競合阻害実験を行った。またM6Pによる阻害実験を検証するために、siRNAを用いたM6PR抑制実験を行った。

M6PR抑制レベルの検討にはウエスタンブロット法に加え、リアルタイムRT-PCR法を用いてmRNAレベルでの検討も併せて行った。

4. 研究成果

(1) ヒト正常組織由来細胞の培養

ヒト正常組織由来細胞の培養では、繊維芽細胞、微小血管内皮細胞、心筋細胞、腎皮質上皮細胞、尿細管上皮細胞、血管内皮由来細胞以外に、腎臓由来細胞であるメサンギウム細胞も試みたが、安定した培養が確立できなかったために除外した。また、これら正常組織由来細胞は、培養にそれぞれ特異的な培地、添加因子を要求するが、取り込み実験の基礎

検討の際に、培地や増殖因子などにより取り込みに差が認められた。従って、取り込み実験に際しては、培養条件をなるべく統一化して取り込みに影響を及ぼすカウンターイオン等の影響を排除した均質な取り込み評価系を確立した。

(2) M6PR タンパク質発現レベルの検討

M6PR の発現レベルは、ウエスタンブロット法を用いて解析を行った。その結果の一例を図1に示す。これらの結果から、心筋由来の細胞と比較し、腎臓系の細胞において M6PR の発現が低いことを明らかにした。また、ヒト正常組織由来 RNA を用いて M6PR の mRNA 発現を検討したところ(図2)、腎臓、心臓における M6PR の発現は正常組織由来細胞における発現と相関を示すことから、本評価系で検討した M6PR 依存的な酵素取り込みは *in vivo* にも反映することが期待できる。

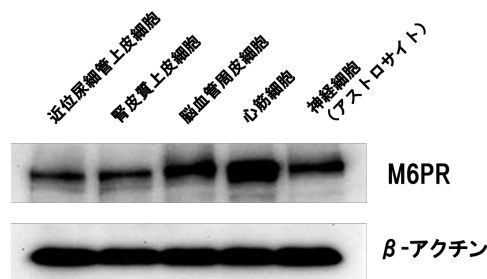


図1 各種正常組織由来細胞における M6PR タンパク質の発現レベル

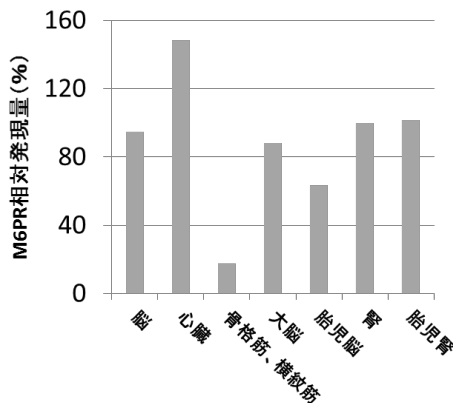


図2 正常組織由来 M6PR mRNA 相対発現レベル

(3) GLA の取り込みの検討

各種細胞における GLA 活性は蛍光基質を用いた酵素活性測定法を用いて解析を行った。これまで、患者由来繊維芽細胞や神経系の株化細胞を用いた検討がなされてきたが、正常組織由来細胞での検討はこれまでなされていない。そこで、初めに酵素添加の濃度依存性、並びに時間依存性の検討を行った。その結果、ある一定のレベルまでに濃度依存性、時間依存性が認められ、最適と思わ

れる条件にて各細胞における取り込み実験を行った。その結果、M6PR の発現が低かった腎臓由来細胞(近位尿細管上皮・腎皮質上皮)において、心筋由来細胞よりも GLA の取り込みが高いことを明らかにした(図3)

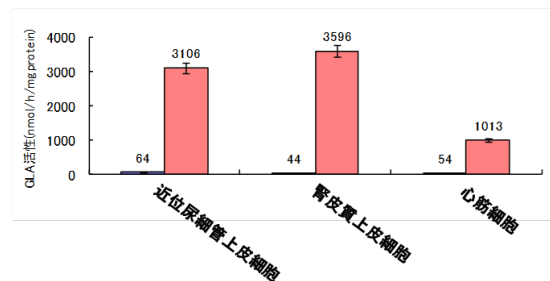


図3 腎臓、心臓由来正常細胞における GLA の取り込み

(4) M6PR 非依存的酵素取り込み機構の解析

M6PR 以外に、GLA の取り込みに関与する分子の存在を明らかにするために、M6P 添加による基質競合阻害実験を行った。その結果、GLA 添加では、M6PR の発現が低かった腎臓由来細胞での取り込み阻害効率が高いことを明らかにした。よって、腎臓細胞における GLA の取り込みには、M6PR 以外の因子が関与している可能性が考えられた。しかしながら、従来から、この M6PR の阻害実験に用いられている M6P 濃度は高濃度であること、また、他の因子に与える影響も考えられたことから、siRNA を用いて M6PR を抑制した実験を行うこととした。まず、基礎検討を繊維芽細胞を用いて行ったところ、抑制が認められ、酵素取り込みの低下も確認された(図4)

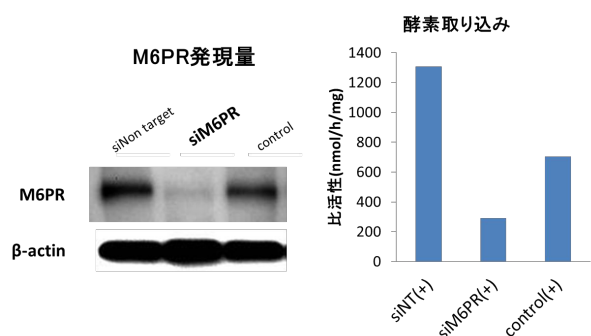


図4 siRNA による M6PR 抑制と GLA 酵素取り込み量

腎臓由来細胞においても同様の検討を行ったところ、取り込みの抑制は起きたものの、M6P 添加と比較し、有意に小さな影響であった。よって、M6P による他のレセプターへの影響などを考慮する必要があると思われる。また、各種細胞での検討を行ったが、安定した抑制と取り込みのデータが得られて

いない。今後、安定した遺伝子抑制を行った上での検討が必要かと思われる。

以上より、GLAの取り込みにM6PRを介さない機構が存在することを見いだした。また、検討を行った正常組織由来細胞のなかで、取り込み特性に違いが認められたこと、正常臓器の mRNA 発現と相関性も認められることから、本培養系は由来臓器の特性を維持しており、臓器ごとの取り込みを推測する評価に本実験系が応用できると思われる。

また、薬物の取り込みに重要な血管内皮細胞において、平面培養に加えて、マトリゲル中での立体培養、さらにスフェロイド形成による三次元培養下での薬物取り込み評価を検討することとし、基礎検討も行った。現時点では、評価系の構築が試行できた状態であるが、より *in vivo* を反映した評価系の構築が可能になるかと思われる。

近年、医薬品全体に占めるバイオ医薬品の割合が急増していることから、本研究は、今後、バイオ医薬品の取り込みを簡便に *in vitro* で行う評価系の構築の基盤になると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Nakano S, Morizane Y, Makisaka N, Suzuki T, Togawa T, Tsukimura T, Kawashima I, Sakuraba H, Shibasaki F. Development of a highly sensitive immuno-PCR assay for the measurement of β -galactosidase A protein levels in serum and plasma., PLoS One. 2013 Nov 13;8(11):e78588.
doi: 10.1371/journal.pone.0078588.

Ogawa Y, Tanaka M, Tanabe M, Suzuki T, Togawa T, Fukushige T, Kanekura T, Sakuraba H, Oishi K. Impaired neural differentiation of induced pluripotent stem cells generated from a mouse model of Sandhoff disease. PLoS One. 2013;8(1):e55856.
doi: 10.1371/journal.pone.0055856.

Saito S, Ohno K, Sekijima M, Suzuki T, Sakuraba H. Database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant arylsulfatase B structures in mucopolysaccharidosis type VI. J Hum Genet. 2012 Apr;57(4):280-2.
doi:10.1038/jhg.2012.6.

Saito S, Ohno K, Suzuki T, Sakuraba H. Structural bases of Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. Mol

Genet Metab. 2012 Feb;105(2):244-8.
doi: 10.1016/j.yjmgme.2011.11.004.

[学会発表](計 2 件)

鈴木俊宏、石原茉祐花、小林敦子、月村考宏、兎川 忠靖、櫻庭 均、小笠原裕樹、ヒト正常組織由来細胞を用いた β -ガラクトシダーゼ取り込み機構の検討、日本薬学会 134 年会、2014 年 3 月 28-30 日、熊本

鈴木俊宏、兎川忠靖、月村考宏、櫻庭 均、ヒト正常組織由来培養細胞における組換えリソソーム酵素の取り込み、日本生化学会大会、2012 年 12 月 14-16 日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 俊宏 (SUZUKI Toshihiro)
明治薬科大学・薬学部・専任講師
研究者番号：80322527