

〈学位論文の紹介〉

「バイオマテリアルの機能改変：ポリエチレングリコール (PEG) 及びヒアルロン酸 (HA) を用いたバイオコンジュゲート」
(桜井 勝清)

稲田 祐二

桐蔭人間科学工学センター教授

桐蔭横浜大学大学院工学研究科博士課程材料工学専攻の桜井勝清氏は本年 3 月、工学博士の学位を取得した。同氏の研究成果は次の 6 編の論文として国際誌に掲載あるいは掲載予定となっている (表 1)。

論文は表題に示されたように、「バイオマテリアルの機能改変」である。バイオマテリアルは生体内で生命を維持するために不可欠な物質であり、遺伝子、タンパク質、糖類、生理活性物質が含まれる。これらの物質の相互作用によって精巧緻密な生命現象は発現される。そこでこれらの生体物質 (バイオマテリアル) を生体より取り出し、医学、薬学、あるいは工学の応用分野で利用しようとする際、それぞれの目的にかなう機能を賦与する必要がある。本論文ではバイオ物質に合成高分子の一つであるポリエチレングリコール (PEG)、または多糖類の一つであるヒアルロン酸 (HA) を結合させたバイオコンジュゲート物質を設計創製した。

1. ポリエチレングリコール (PEG) で修飾されたバイオマテリアル (表 2 A)

タンパク質に PEG を結合させる研究は 1977 年に 2 つのグループによって発表された。その 1 つは Davis らによる研究でカタラーゼに PEG を結合させると抗原性の消失が観察された。また Schon ら

	バイオ物質 (性質)	修飾剤	バイオコンジュゲート (性質)	作用 (用途)	文献
A	アスパラギナーゼ (抗原性)	合成高分子 ポリエチレングリコール (PEG)	PEG-アスパラギナーゼ (抗原性の消失)	白血病の治療 ラクトンの光学分割 ペプチド合成	4、6 3、4 4、5
	リパーゼ (加水分解反応)		PEG-リパーゼ (合成反応)		
	プロテアーゼ (加水分解反応)		PEG-プロテアーゼ (合成反応)		
B	スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)	天然高分子 ヒアルロン酸 (HA)	HA-SOD (活性酸素消去能の増大)	炎症・浮腫の治療	1 2
	マンガン (Mn)		Mn-HA (活性酸素消去能発現)		

表 2 バイオコンジュゲートの設計と創製

は卵白アルブミンに PEG を結合させたコンジュゲートを動物に投与すると免疫寛容現象が起こる事を報告した。1978 年私達は白血病治療剤アスパラギナーゼ(大腸菌より単離)の抗原性を消失させるためアスパラギナーゼに PEG を結合させ薬剤としての臨床試験への道を開いた。さらに 1984 年、加水分解酵素に PEG を結合させることにより、酵素が有機溶剤に溶解するのみならず有機溶媒中で加水分解の逆反応、すなわち合成反応が進行する現象を発見した。それ以来この分野の研究は飛躍的に進歩しつつある。

これらの研究を背景にし、桜井氏はアスパラギナーゼについては、薬剤として均一な PEG-アスパラギナーゼ製品を得るため、修飾剤である活性化 PEG の合成、規格が特定化され安全性の確認された PEG-アスパラギナーゼを得る事に成功した。そのため白血病患者に PEG-アスパラギナーゼを投与する臨床試験への道が開かれた。そこで専門医が未修飾アスパラギナーゼの投与で重篤なアレルギー反応と副作用を起こしている白血病患者に治療を試み、PEG-アスパラギナーゼの高い治療効果が確認された(表 2, A)。

次に PEG-酵素タンパク質コンジュゲートが農工学分野でも応用される可能性を示した(表 2 A)。活性化 PEG で修飾されたリパーゼ(PEG-リパーゼ)は種々のアルコールに溶解し、酵素の持つ基質特異性に従って、ラセミ体 δ -デカラクトンの不斉アルコール分解を触媒した。PEG-リパーゼは食品添加物や香料の合成に応用できる可能性がある。活性化 PEG で修飾されたタンパク分解酵素(トリプシン、キモトリプシン、パパイインなど)は、メタノールなどの有機溶媒に溶解してその活性を維持し、ペプチドの縮合反応を効率よく触媒した。またこれらの PEG-タンパク分解酵素コンジュゲートを、固相系ペプチド合成装置において縮合剤の代わりに用いれば効率よく固相担体上でペプチド合成ができる。実際、利用価値の高いペプチド(ブラジキニン、カルシトニン誘導体など)の合成も可能であり、商品化されるに至っている。

2. ヒアルロン酸(HA)で修飾されたスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)及びマンガン(Mn)(表 2 B)

修飾剤として生体高分子であるヒアルロン酸(HA)を用いてバイオ物質のコンジュゲートを作成する研究は、修飾剤の機能をバイオ物質に積極的に賦与しようという、独創的なアプローチである。スーパーオキシドアニオン(O_2^-)やヒドロキシラジカル($OH \cdot$)は組織の炎症の機序に重要な役割を演じているが、炎症が生体に有害である場合はこれらの活性酸素群を除去する必要がある。そこで、スーパーオキシドアニオン(O_2^-)を消去するスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)と、活性酸素群で徐々に分解

表 1 本研究に関連する論文

- (1) Sakurai K., Andoh M. Yamada M. Kodera Y. Nishimura H. Hiroto M. Matsushima A. Aoyama M. Yamamoto H. and Inada Y.: Suppression of ischemic edema in mice by manganese-hyaluronate conjugate. *Jpn. J. Pharmacol.* **74**, 117~120, 1997
- (2) Sakurai K., Miyazaki K. Kodera Y. Nishimura H. Shingu M. and Inada Y.: Anti-inflammatory activity of superoxide dismutase conjugated with sodium hyaluronate. *Glycoconjugate J.* (in Press)
- (3) Uemura T. Furukawa M. Kodera Y. Hiroto M. Matsushima A. Kuno H. Matsushita H. Sakurai K. and Inada Y.: Polyethylene glycol modified lipase catalyzes symmetric alcoholysis of δ -decalactone in n-decanol. *Biotech. Lett.* **17**, 61-66, 1995
- (4) Ono K. Kai Y. Maeda H. Samizo F. Sakurai K. Nishimura H. and Inada Y.: Selective synthesis of 2,4-bis(o-methoxypolyethylene glycol)-6-chloro-s-triazine as a protein modifier. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* **2**, 61-65, 1991
- (5) Sakurai K., Kashimoto K. Kodera Y. and Inada Y.: Solid phase synthesis of peptides with polyethylene glycol-modified protease in organic solvents. *Biotech. Lett.* **12**, 685-688, 1990
- (6) Yoshimoto T. Nishimura H. Saito Y. Sakurai K. Kamisaki Y. Wada H. Sako M. Tsujino G. and Inada Y.: Characterication of polyethylene glycol-modified L-asparaginase from *Escherichia coli* and its application to therapy of leukemia. *Jpn. J. Cancer. Res. (Gann)* **77**, 1264-1270, 1986

しその際水酸ラジカルを消去する生分解性の HA とのコンジュゲート (HA-SOD) を作成した。このコンジュゲートはスーパーオキシドアニオンが関与することが示されている炎症モデル、虚血—再灌流によるマウス後肢の浮腫、ラットのカラゲニン胸膜炎およびアジュバンド関節炎で高い炎症抑制効果を示した。HA または SOD 単独投与では殆ど炎症は抑制されなかった。さらに HA-SOD の抗体反応性、免疫原性はともに未修飾酵素と比較して著しく低下した。

SOD の活性中心が金属錯体であることから、さらに生体内での抗原性や短い半減期などの問題をもつタンパク質を含まない、マンガンイオンと HA のコンジュゲート (Mn-HA) を調製し、そのスーパーオキシドアニオン消去能、虚血—再灌流による浮腫の抑制効果を検討した。Mn-HA は in vitro でスーパーオキシドアニオン及び水酸ラジカルの両方を消去し、マウス後肢の虚血—再灌流による浮腫は Mn-HA によって顕著に抑制された。

3. おわりに

このように本研究では医薬品としての、PEG—アスパラギナーゼの開発、PEG—タンパク分解酵素の農工学分野での応用可能性を取り扱ったが、この成果をもとにこれらの PEG—酵素が医学、薬学、農学及び工学の各分野での実用化が期待されている。一方、HA によるコンジュゲートに関しては本研究が端緒になりさらに発展すると期待される。以上の研究成果を表 3 にまとめた。

おわりに上記の研究を行い本学出身の工学博士第一号となった桜井勝清氏を紹介する。同氏は 1965 年東北大学教育学部を卒業され、同年生化学工業 (株) に入社され現在に至っている。国際誌に論文 22 編が掲載され、また特許出願 74 件に達する。同氏の今後の発展を期待している。

表 3 バイオマテリアルの機能改変

バイオマテリアル	研究概要	結果および有用性
PEG—アスパラギナーゼ	白血病治療薬としての開発研究	活性化 PEG—アスパラギナーゼの品質を保証する規格を特定化し、安全性も確認。患者に投与され副作用はなく効果を示した。米国で医薬品として認可。
PEG—リパーゼ	基質であるアルコール中でのラセミ体 α -ラクトンの不斉アルコール分解反応の研究	ラセミ体ラクトンの光学分割ができ、有用な抗生物質や香料の大量調整が可能。
PEG—タンパク分解酵素	酵素の基質特異性を利用してペプチドを合成するシステム研究	PEG—タンパク分解酵素を利用したペプチド合成。穏和な条件下加水分解の逆反応 (ペプチド合成反応) が進行する。本法を用いペプチドを合成商品化。
ヒアルロン酸—スーパーオキシドジスムターゼ (HA—SOD)	HA の機能を積極的に賦与し、生分解性の新しい抗炎症剤の開発研究	各種炎症モデル、マウス後肢における虚血—再灌流に伴う炎症、カラゲニン胸膜炎及びアジュバンド関節炎で顕著な抗炎症効果。
マンガン—ヒアルロン酸 (Mn—Ha)	SOD の活性中心を模倣した金属錯体によるスーパーオキシドアニオンの消去と抗炎症作用の研究	in vitro で O_2^- 及び $OH\cdot$ を消去。マウス後肢虚血—再灌流による浮腫の発症を抑制。今後の研究に期待できる新しいアプローチである。