

Targeted drug delivery to bone :
characterization of human tissue-nonspecific
alkaline phosphatase tagged with an acidic
oligopeptide

著者	Nishioka Tatsuo
著者別名	西岡, 達雄
journal or publication title	博士学位論文要旨 論文内容の要旨および論文審査 結果の要旨 / 金沢大学大学院自然科学研究科
volume	平成19年3月
page range	355-359
year	2007-03-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/14638

氏名	西岡 達雄
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第810号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Targeted Drug Delivery to Bone: Characterization of Human Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase Tagged with an Acidic Oligopeptide (ヒト組織非特異的アルカリフォスファターゼの酸性オリゴペプチド共役による骨へのターゲティング)
論文審査委員(主査)	宮本 謙一(医学部附属病院・教授)
論文審査委員(副査)	辻 彰(自然科学研究科・教授), 米田 幸雄(自然科学研究科・教授), 山田 清文(自然科学研究科・教授), 横川 弘一(医学部附属病院・助教授)

Abstract

Hypophosphatasia is caused by deficiency of activity of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP), resulting in a defect of bone mineralization. Enzyme replacement therapy (ERT) was attempted but little clinical improvement was achieved.

Attaining clinical effectiveness with ERT for hypophosphatasia requires delivering functional TNSALP enzyme to bone. We tagged the C-terminal-anchorless TNSALP enzyme with an acidic oligopeptide (a six or eight residue stretch of L-Asp), which markedly increased affinity for hydroxyapatite abundant in bone. We compared the biochemical properties of the purified tagged and untagged enzymes derived from Chinese hamster ovary cell lines.

The specific activities of the purified enzymes tagged with the acidic oligopeptide were the same as the untagged enzyme. *In vitro* affinity experiments showed the tagged enzymes had 10-fold higher affinity for hydroxyapatite than the untagged enzyme. Lectin affinity chromatography for carbohydrate structure showed little difference among the three enzymes. Biodistribution pattern from single infusion of the fluorescence-labeled enzymes into mice showed the amount of tagged enzyme retained in bone was 4-fold greater than the untagged enzyme. The tagged enzymes demonstrated longer retention in bone and were present in higher concentration continuously up to one week. *In vitro* mineralization assays with each of three enzymes in the presence of high concentrations of pyrophosphate provided evidence of bone mineralization with the bone marrow from a hypophosphatasia patient.

These results show the anchorless enzymes tagged with an acidic oligopeptide are delivered efficiently and function bioactively in bone mineralization, suggesting the potential use of these tagged enzymes in ERT for hypophosphatasia.

緒言

Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) は生体内に存在する alkaline phosphatase (ALP) のアイソザイムの一つであり、主に肝臓、腎臓、骨にその局在が認められている。Hypophosphatasia は TNSALP 活性の欠損によって引き起こされる疾患であり、表現型として主に骨の形成異常が見られ、その患者はくる病または骨軟化症の病態を示す。また臨床的にその表現型は幅広く、重症の場合では脆弱な骨格形成により生後数日または数週間で死亡してしまう。

TNSALP は骨芽細胞に膜結合型タンパク質として存在し、hypophosphatasia 患者で見られる骨の形成異常は TNSALP が骨の構築に重要な役割を持つことを示唆するものである。骨芽細胞は骨において骨基質を産生し、そこにリン酸カルシウム結晶が沈着することにより石灰化が起こる。石灰化の開始は骨芽細胞が産生する基質小胞内で起こり、基質小胞はリン酸カルシウム結晶の析出のために最適な環境を作り出している。基質小胞はその膜上に TNSALP を有しており、TNSALP は pyrophosphate (PP_i) を monophosphate (P_i) に分解する活性を持つことから、TNSALP の生理的な役割は強い石灰化の阻害作用を持つ PP_i を分解し、石灰化に必要な無機分子である P_i に変換することにより石灰化を促進することであると考えられている。このように、hypophosphatasia では TNSALP 活性の欠損により PP_i が蓄積し、骨の石灰化が抑制されることで骨の形成異常をきたす疾患である。

Hypophosphatasia は酵素の欠損によって引き起こされる疾患であるので、その治療方法として、欠損した酵素を補う酵素補充療法が試みられた。しかしながら、今まで行われた hypophosphatasia 患者に対する酵素補充療法はほとんど効果を示していない。この結果は全身投与された酵素が骨において生理的に有効なレベルに達していないとの考察がなされており、効果的な酵素の骨へのデリバリーがその酵素補充療法に有用であると考えられている。近年、Kasugai らが酸性アミノ酸から成るオリゴペプチドが全身投与後、選択的に骨へ移行し、そこへ留まることを発見した。さらに、エストラジオールをこの酸性オリゴペプチドで修飾することにより、エストラジオールの骨への選択的なデリバリーに成功し、卵巣切除マウスの骨密度の改善と、子宮および肝臓に対するエストラジオールの副作用の軽減が認められた。

本研究では Hypophosphatasia の酵素補充療法を確立することを目的とし、酸性オリゴペプチドを共役した TNSALP を精製し、その性質をみたものである。

方法・結果

TNSALP と酸性オリゴペプチド共役 TNSALP を得るため、それらの DNA コンストラクトを構築した。TNSALP は glycosylphosphatidylinositol (GPI) を介して細胞膜に結合しており、それには TNSALP タンパク質の C 末端に存在する GPI anchoring signal peptide が必要である。まず、TNSALP を分泌型の酵素とするため TNSALP cDNA から GPI anchoring signal peptide をコードする配列を除くこととした。また酸性オリゴペプチド共役 TNSALP を得るため、6 つあるいは 8 つのアスパラギン酸をコードする DNA 配列を TNSALP の C 末端に導入した。これらの酵素を以下、rhTNSALP (分泌型遺伝子組み換えヒト TNSALP)、CD6-TNSALP (6 つのアスパラギン酸を共役した分泌型遺伝子組み換えヒト TNSALP)、CD8-TNSALP (8 つのアスパラギン酸を共役した分泌型遺伝子組み換えヒト TNSALP) と呼ぶ。

これら3つのcDNAをそれぞれ発現ベクターに組み込み、Chinese hamster ovary細胞で一過性に発現させたところ、それらの酵素の95%以上がその培養上清中に分泌され、その分泌量はすべての酵素においてほぼ等しかった。それぞれの安定発現株を作製し、その培養上清を12時間毎に回収して酵素を得た。その酵素はDEAEとSephacryl S-400-HRカラムを用い精製され、rhTNSALP、CD6-TNSALP、CD8-TNSALPの収率はそれぞれ32%、62%、56%であり、rhTNSALPの収率はカラムからの溶出ピークが低く、CD6-およびCD8-TNSALPの収率に比べ低い値であった。

これらの精製された酵素はすべてほぼ同程度のspecific activityおよびMichaelis定数を有しており、その酵素活性においては酸性オリゴペプチドの影響はほとんどみられなかった。一方、酸性オリゴペプチド共役酵素のヒドロキシアパタイトとの親和性は非共役酵素と比べ高く、Kd値として1/10以下であった。

タンパク質中の糖鎖は生体内で重要な役割を持つことが知られており、TNSALPはその糖鎖構造中の末端のほとんどがシアル酸で占められているという特徴を持つ。そこで精製された酵素の糖鎖構造をみるため、lectin affinity chromatographyを用いた。糖鎖構造中の末端マンノースに高い親和性を持つconcanavalin A (ConA)を用い、酵素のConAに対する親和性を確認した。その結果、すべての酵素はConAカラムからほぼ等しい溶出パターンを示し、一様に末端マンノースを含むことが示唆された。また、糖鎖構造中の末端シアル酸に高い親和性を持つwheat germ agglutinin (WGA)を用いて、酵素の末端シアル酸の含有量を確認した。その結果、シアル酸含有量はrhTNSALP > CD6-TNSALP > CD8-TNSALPの順であることが予想され、またいずれの酵素もその糖鎖構造中に多量のN-acetyl-D-glucosamine残基を持つことが示唆された。また、neuraminidaseで糖鎖の末端シアル酸を除去後、SDS-PAGEにて分子量の変化をみると、いずれの酵素も同程度の分子量低下が認められた。これらの結果から、酸性オリゴペプチド共役酵素は非共役酵素と比べわずかな末端シアル酸の含有量の低下は認められるが、その程度は低いものであると考えられる。

酵素の骨への移行性を*in vivo*で確認するため、酵素を蛍光で標識し、マウスへ全身投与した。そのマウスを6時間、24時間、72時間、168時間後に屠殺し、大腿骨切片を得た。大腿骨骨端部への酵素分布を観察すると、成長板には酵素の分布は認められなかったが、石灰化部分には酵素の分布を認めた。酸性オリゴペプチド共役酵素は投与6時間後、非共役酵素と比べおよそ4倍の高い分布が石灰化部分に認められた。さらに酸性オリゴペプチド共役酵素は投与後1週間にわたり非共役酵素の2~3倍の量を石灰化部分に留めた。またCD6-TNSALPとCD8-TNSALPの間で骨への分布に差は認められなかった。骨以外への酵素分布をみると肝臓に比較的高い酵素分布が認められたが、3つの酵素間で差は認められなかった。

Hypophosphatasia患者から得た骨髄細胞を用いて、それらの石灰化と酵素の及ぼす影響を確認した。その骨髄細胞を β -glycerophosphate存在下で培養しても石灰化を認めることが出来なかったが、精製したいずれかの酵素を加えることによって β -glycerophosphate存在下で石灰化を認めた。また、 β -glycerophosphateの代わりに P_i を用いると、酵素非存在下でも石灰化がみられた。 P_i 存在下で酵素を加えてもその石灰化に相加的な効果は認められなかった。これらの結果から、この骨髄細胞培養系においてTNSALPは β -glycerophosphateか

ら P_i を遊離させることによって石灰化に寄与することが示唆された。これらの酵素が生理的な石灰化の阻害物質である PP_i を加水分解することができるかを確認するため、 P_i 存在下の骨髄細胞培養系に PP_i を加えた。 PP_i 添加により、 P_i 存在下における石灰化は完全に阻害されたが、精製したいずれかの酵素を加えることによって石灰化は PP_i 無添加群の 70~80% にまで回復した。上記の結果より rhTNSALP、CD6-TNSALP および CD8-TNSALP のいずれも PP_i を分解することによって骨の石灰化に対し寄与することが示唆された。

結論

この研究において以下のことを証明することができた。

1. TNSALP cDNA から GPI anchoring signal peptide をコードする配列を除去することにより、分泌型として 95%以上の酵素が培養上清中へ分泌された。この GPI anchor の除去は多量の酵素を効果的に回収することを可能にした。
2. 6つおよび8つの酸性アミノ酸から成る酸性オリゴペプチドを rhTNSALP の C 末端に共役させることにより、酵素の活性およびその糖鎖構造にほとんど影響を与えることなくハイドロキシアパタイトへの親和性を非共役酵素の 10 倍以上に高めることができた。
3. 蛍光標識後、酸性オリゴペプチド共役および非共役酵素をマウスに投与した結果、酸性オリゴペプチドは骨への酵素の分布を 1 週間にわたり 2~4 倍に高めた。また脳、肺、心臓、肝臓、脾臓および腎臓への分布には酸性オリゴペプチド共役酵素と非共役酵素間でその差は認められなかった。
4. 酸性オリゴペプチド共役酵素は非共役酵素と同様に、hypophosphatasia 患者から得た骨髄細胞を用いた培養系において、強い石灰化阻害作用を持つ PP_i を分解することにより石灰化を誘導することが示された。

以上、本研究は、酸性オリゴペプチドを用いた骨への drug delivery に関する新たな可能性を示すものである。つまり巨大な分子である酵素を骨へデリバリーできることは、hypophosphatasia における酵素補充療法の臨床的な応用を大いに期待させるものである。

学位論文審査結果の要旨

Hypophosphatasia は tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNSALP) 活性の欠損によって引き起こされる疾患であり、表現型として主に骨の形成異常が見られる。Hypophosphatasia に対する酵素補充療法が試みられたが、その臨床的な有効性はほとんど認められていない。そこで本研究は、Miyamoto らが開発したヒドロキシアパタイトに高親和性を持つ酸性オリゴペプチドを TNSALP に結合して骨集積生が高められないかを検討した。

まず、TNSALP を分泌型の酵素とするため TNSALP cDNA の C 末端に位置する GPI anchoring signal peptide をコードする配列を除いた。また酸性オリゴペプチド共役 TNSALP を得るため、6 ケあるいは 8 ケの連続するアスパラギン酸をコードする DNA 配列を TNSALP の C 末端に導入した。これらの酵素を Chinese hamster ovary cell へトランスフェクトし、培養上清中に分泌させた。酸性オリゴペプチドを共役した酵素は、非共役酵素とほぼ同等の酵素活性を持ち、lectin affinity chromatography によっていずれの酵素もほぼ同様の糖鎖構造を持つだけでなく、非共役酵素の 10 倍以上のヒドロキシアパタイト親和性を持つことが示された。これらをマウスに全身投与して大腿骨への酵素の分布を観察すると、酸性オリゴペプチド共役酵素は、非共役酵素と比較して投与 6 時間後で 4 倍が骨の石灰化部分へ分布し、投与後 1 週間にわたり 2 倍以上が滞留した。さらに、hypophosphatasia 患者からの骨髄細胞に対してペプチド共役酵素は *in vitro* で石灰化を引き起こすことを確認した。

このように、本研究は、hypophosphatasia に対する画期的な酵素補充療法に結びつく成果を示した労作であり、博士（薬学）を授与するに値すると評価された。