

平成 31 年 2 月 15 日

崇城大学大学院
工学研究科委員会
研究科長 小 野 長 門 殿

論文審査委員
主査 進 正志



論文審査結果の報告 (甲)

論文提出者	山 本 雄 大 (1619D04)
論文題名	薬物動態解析のための免疫化学的方法の開発研究
審査委員	主査 教授 進 正 志 副査 教授 齋 田 哲 也 副査 教授 安 藤 祥 司

論文審査結果の要旨

薬物動態に関する情報は、より効果的で安全な薬物治療を行う上で非常に重要である。従来より、血中や組織中の薬物濃度の測定法としては HPLC や LC/ MS/MS などの分離分析法が、組織・細胞内の薬物局在の解析法としてはアイソトープ標識薬物を用いる autoradiography 法が存在するが、これらは、高額な機器が必要であったり、放射性物質を取り扱うための特別な施設が必要であるなどの様々な短所を持っている。従って、これら従来法に比べて簡便、安価、安全であり、同等以上の正確性、特異性を持つ解析法の開発が求められている。そのための方法論として、抗原抗体反応を原理とする免疫化学的方法に高い期待が寄せられている。

本研究では、免疫化学的方法の開発が望まれているにもかかわらず、未だなされていない 5 種類のがん分子標的治療薬と 2 型糖尿病治療薬について免疫化学的解析法の開発を行った。

(1) 4 種類のがん分子標的治療薬 (lapatinib、nilotinib、erlotinib、sorafenib) に対する免疫測定法である competitive ELISA の開発を行った。がん分子標的治療薬の多くは、生体内で多種多様に代謝される。そのため、特異的な免疫測定法を開発するためには、その薬物の代謝産物とは交差反応を示さない特異抗体を作製する必要がある。薬物はハプテンであるためキャリアタンパク質と結合させた複合体を作製し抗原として用いるが、特異抗体を得るためには、この複合体の構造が重要なポイントであり、抗体の出来を大きく左右する。また、今回ターゲットとするがん分子標的治療薬は、キャリアタンパク質と結合できる官能基を持っていない。以上の知見から、薬物の主要代謝物の構造を考慮し、キャリアタンパク質と結合できる官能基を有する薬物の部分構造体を選択し、ハプテン抗原

を作製することで、それぞれの薬物の主要代謝物には交差反応性を示さない特異抗体を得ることに成功した。これらの特異抗体を用いて、4種類のがん分子標的治療薬に対するTDMや動態研究に応用可能な簡易かつ特異的で高感度なcompetitive ELISAの開発に成功した。

(2) がん分子標的治療薬である imatinib に対する sandwich ELISA の開発を行った。薬物の代謝物が多種多様に存在する場合、1種類の抗体ではその薬物のすべての代謝物の影響を取り除くことができない可能性があるため、1種類の抗体を用いる competitive ELISA では、十分な特異性が得られない場合がある。そこで、立体障害を起こさずに同時に薬物の両端から結合し、薬物のほぼ全ての構造を包み込むことができる2種類の抗体を作製し、これらの抗体を用いることで、薬物がどのように代謝されたとしても、その代謝物の影響を受けない超特異的な sandwich ELISA の開発が可能になると考えた。しかし、これまでは、分子量1,000以下の低分子薬物は小さすぎて2種類の抗体でサンドイッチすることができないと考えられ、低分子薬物の sandwich 免疫測定法は殆ど開発されていない。本研究では、分子量493.6である imatinib のほぼ中央から分割した構造を取る2種類の部分構造体を用いてそれぞれハプテン抗原を作製し、imatinib の異なるエピトープを認識する2種類の特異抗体の作製に成功した。この2種類の特異抗体を用いて、imatinib に対するTDMや動態研究に応用可能な簡易かつ特異的で高感度な sandwich ELISA の開発に成功した。また、本法は薬物に対しては、最も低分子薬物に対する sandwich ELISA であった。

(3) 2型糖尿病治療薬 alogliptin に対する特異モノクローナル抗体の作製と免疫組織化学法の開発を行った。一般に薬物動態は、薬物血中濃度をパラメーターとして研究されている。しかし、薬効・副作用の予測やその機構解明、薬物相互作用の解析などのためには、それだけでは十分とは言えない場合もあり、組織・細胞レベルでの薬物動態に関するデータも必要となる。各種薬物の組織・細胞レベルでの薬物動態に関する詳細な情報の蓄積は、生体での薬物の作用や副作用の機序を解析するうえで、また薬物のより適切な臨床使用法の研究開発にとって、基礎的かつ重要なデータとなると考えられる。今回、2型糖尿病治療薬である Alogliptin (AG) に対する特異モノクローナル抗体の作製に成功し、本抗体を用いた免疫組織化学法により小腸各部位での AG の局在を明らかにした。その結果、AG は十二指腸、空腸に比べて回腸からより積極的に吸収されている可能性、AG が小腸でのペプチドの吸収や、腸液の分泌、腸管の運動などに影響を与える可能性などが示された。

以上報告した薬物の免疫化学的解析法は、血液中・組織中の薬物濃度や薬物の組織・細胞内局在を簡便に解析できることから、これら薬物の動態研究のための有用なツールになると期待される。さらに、この免疫化学的解析法の開発技術は、今回ターゲットとした薬物のみならず、他の薬物にも応用可能である。

最終試験結果の要旨

本論文において、がん分子標的治療薬の薬物血中濃度を簡易かつ迅速に解析可能な非常に特異的な ELISA 法を開発し、これらが TDM や薬物動態研究に応用可能であること、また DPP-4 阻害薬 Alogliptin に対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いた免疫組織化学法によって、組織・細胞レベルでの薬物動態を解析可能なことが報告された。審査委員らは、本研究は基礎および臨床の両面において重要な成果であり、本論文提出者は博士(工学)の学位を得る資格があると認めた。さらに公聴会を開いて提出論文に関する発表を行わせ、論文内容および関連する分野について口頭による試験を行った後、その内容を専攻内判定会議で検討し、最終試験に合格したものと認めた。