




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 祐太郎 (1719D01)
論文題名	免疫組織化学法による低分子医薬品の薬物動態研究
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

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おり、そのデータは臨床で安全かつ効果的に薬物療法を行う上で非常に重要である。しかし、薬物の作用や副作用の発現部位や機序解明などのためには、血中濃度を測定しただけでは十分とは言えないことも事実であり、薬物動態のより正確な把握のためには、組織・細胞レベルでの薬物局在とその時間経過による変化を調べる必要がある。組織・細胞レベルでの薬物動態の解析法として従来用いられていたアイソトープ標識薬物を用いる autoradiography 法や近年開発された Imaging Mass Spectrometry (MS)法などが存在するが、これらには、放射性物質を取り扱うための特別な区画を設置する必要であったり、高額な機器が必要であったりといった様々な短所が存在し、一般の研究室に普及しているとは言い難い。これらに比べて「薬物をターゲットとする免疫組織化学法」は、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であり、これまでに種々の薬物について組織・細胞レベルでの薬物動態を報告している。

本研究では、未だ組織・細胞レベルでの詳細な薬物動態データが得られていない低分子医薬品を研究対象として、それらの組織・細胞内動態を免疫組織化学的方法により解析した。

1. 2 種類の抗 MRSA 薬 Teicoplanin 及び Daptomycin のそれぞれに対する特異抗体を作製し、それらを用いた免疫組織化学法により各薬物の組織・細胞レベルでの動態解析を行った。その結果、Teicoplanin は近位尿細管上皮細胞の微絨毛より活発に再吸収されていること、投与後 24 時間でほぼ腎臓から排出されており、投与後 8 日でも多量に蓄積していた Vancomycin に比べて蓄積性が低いことを示した。Teicoplanin が Vancomycin に比べて副作用のリスクが低いのは、この蓄積性の差に起因している可能性が示された。この蓄積性の差は、同じグリコペプチド系抗生物質であっても各薬物の尿細管からの再吸収と分泌に關与する

トランスポーターの種類と発現レベルに違いがある可能性を示唆している。次いで、Daptomycin は近位尿細管上皮細胞の微絨毛基部にリング状の陽性反応が確認され、エンドサイトーシス経路により薬物が細胞内に取り込まれていることを確認した。また、投与後 24 時間では近位尿細管上皮細胞中の核とリソソーム中に Daptomycin が局在していたが、投与後 7 日では腎臓から排泄され長期間蓄積しないことを明らかにした。しかし、投与後 24 時間では近位尿細管上皮細胞中のリソソームに Daptomycin が蓄積していたことから、臨床において数週間連続投与された場合、Daptomycin がリソソームに蓄積し、それが副作用である腎毒性の原因の 1 つとなる可能性が示唆された。

2. 2 型糖尿病治療薬である Alogliptin に対する特異モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法により腎臓及び肝臓での Alogliptin の局在を解析した。その結果、薬物投与後 1 時間の腎臓では、近位尿細管 S3 分節の上皮細胞全体が染色されたが、S1, S2 分節は上皮細胞の微絨毛のみが染色されていた。また、遠位尿細管や集合管にも陽性細胞が観察された。投与後 24 時間の腎臓では、近位尿細管 S3 分節には中等度の陽性反応が認められたが、他の領域はほとんど染色されなかった。肝臓では、投与後 1 時間で、薬物代謝酵素を高度に発現している肝小葉のゾーン III の肝細胞にゾーン I の肝細胞よりも強い染色が認められたが、投与後 24 時間ではほぼ消失していた。これらの結果は、Alogliptin の腎臓での再吸収と肝細胞での取り込みが部位によって異なっており、これらのプロセスに 1 つまたは複数のタイプのトランスポーターが関与している可能性を示唆している。さらに、Alogliptin は長期間の使用により、薬物が S3 セグメントに蓄積して行き、副作用を引き起こす可能性が示された。一方、肝臓での副作用は、薬物の蓄積以外の理由によるものである可能性が示唆された。

3. がん細胞に多く出現している EGFR に共有結合を生じ、抗腫瘍効果を示す 2 種類の分子標的治療薬 Afatinib 及び Dacomitinib に対する免疫組織化学法の開発と、これを用いたラット小腸及び皮膚における薬物動態解析を行った。一般的に免疫組織化学法の検出対象である抗原物質(タンパク質, 1 級アミノ基を持つ低分子化合物など)は、ホルマリンや Glutaraldehyde などの架橋剤を用いて抗原のアミノ基と組織内タンパク質のアミノ基を結合させ組織内に固定する。しかし、Afatinib と Dacomitinib は 1 級アミノ基を持たないため架橋剤を用いても組織に固定することはできない。しかし、両薬は α, β -不飽和ケトン部分を有しているので生体内で ErbB ファミリー受容体や他のタンパク質とマイケル付加反応により共有結合を形成する。このようにして形成された Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate は、架橋剤により組織内での固定が可能である。そこで抗 Afatinib 抗体を用いて Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate の局在を解析可能な免疫組織化学法を開発し、ラット腸管及び皮膚における Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate の局在を解析した。本研究の結果より、腸管及び皮膚における Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate の局在は、各組織の EGFR 発現部位とほぼ一致していることが明らかとなった。本研究は、ラットの腸管系及び皮膚における Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate の局在を解明した最初のものであり、Afatinib や Dacomitinib による誘発性下痢や皮膚毒性のメカニズムを解明するうえで有用であると思われる。

最終試験結果の要旨

本論文において、免疫組織化学法により 5 種類の低分子医薬品の組織細胞レベルでの局在と動態を明らかにした。これにより、これら薬物の作用や副作用の機序のより深い理解や副作用の予見に繋がる知見が得られた。さらに、今回開発した薬物の固定にマイケル付加反応を利用する方法は、薬物の免疫組織化学法の適用範囲を広げる有用な方法であると認められた。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。