



Title	バイオ医薬品の不均一性評価法の確立と応用：抗体医薬品の凝集形成メカニズムの解明とAAVベクターの包括的品質評価
Author(s)	丸野, 孝浩
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105489
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 丸 野 孝 浩 ）

論文題名

バイオ医薬品の不均一性評価法の確立と応用:抗体医薬品の凝集形成メカニズムの解明とAAVベクターの包括的品質評価

論文内容の要旨

バイオ医薬品は抗体医薬品や遺伝子治療用ベクターなどを含み、高い治療効果を示す一方で、その構造の複雑性により生じる分子の不均一性が品質変動や安全性の低下に直結することが知られている。抗体医薬品では、特にマイクロメートルサイズの凝集体（ミクロン凝集体）による免疫原性の誘発が重大な課題である。遺伝子治療用アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターでは治療用遺伝子を含まない空粒子（EP）の混在やカプシドタンパク質の翻訳後修飾が生物活性に影響する。本研究はこれら二つに共通する「分子の不均一性」に焦点を当て、様々な分析技術を駆使した品質評価を通じてその根本原因を分子レベルで解明すること（第2章および第3章）、ならびに信頼性の高い品質評価法を確立すること（第4章、第5章および第6章）で、バイオ医薬品開発の科学的基盤を構築することを目的とした。

第2章では近年、臨床での使用が拡大しているプレフィルドシリンジの使用時における抗体医薬品の凝集体形成メカニズムを明らかにした。シリンジから薬液を「押出す」ことで調製された試料中のミクロン凝集体濃度は、「静かに抜き取る」場合に比べて、試験した3種類全ての抗体医薬品において大幅に増加した。シリンジ内表面への吸着量の定量結果と併せて考察した結果、この現象は、プランジャーヘッドがシリンジ内壁を物理的に掃き出す際に、パレル表面に吸着していたタンパク質が剥離し、ミクロン凝集体として溶液中に放出されることが原因である可能性が考えられた。これらの知見は、抗体医薬品と投与デバイス表面との界面相互作用が凝集形成の要因であり、パレル材料や表面処理の選択がプレフィルドシリンジ製剤の安全性向上に直結することを示した。第3章では分析過程における機械的ストレスを介した凝集形成メカニズムの解明を行った。等温滴定型熱量計（ITC）測定は、熱力学に基づいた分子間相互作用解析の手法である。抗体医薬品の品質評価においては、抗原やFc受容体との相互作用の定量的評価に広く利用される。一方で測定中の滴定シリンジによる混合を目的とした攪拌操作が分析対象のタンパク質の安定性に影響を与え、決定される熱力学パラメータの信頼性を損なう可能性が指摘されていた。ここでは、モデルタンパク質を用いて、攪拌条件が結合の熱力学パラメータに与える影響を評価した。結果、高い攪拌回転数では、全タンパク質分子における結合に関与できない画分の割合の有意な増加、ミクロン凝集体の増加およびタンパク質のアンフォールディングが確認された。攪拌回転数を高くすることによる結合に関与できない画分の割合の増加はモデルタンパク質に限らず、抗体医薬品と抗原ペプチドの相互作用でも確認された。

第4章では、AAVベクター試料の品質管理において課題とされてきた、空粒子-完全粒子比（目的の治療用遺伝子を含む完全粒子（FP）とEPの比）を決定する方法の確立を超遠心分析沈降速度法により行った。第5章では、製造量が 1×10^{12} vg（ベクターゲノム）に満たない小スケール製造を基盤とした製造工程の最適化を目指す段階などにおいても空粒子-完全粒子比を決定できる方法を超遠心分析バンド沈降速度法により確立した。第6章ではAAVベクターの製造工程における品質特性（QA）の変動とその生物活性への影響評価を行った。AAVベクター試料中に含まれるEPは生物活性に影響を与えることから、AAVベクターのQAの変動と生物活性の関係を調べるには高純度のFP試料を準備する必要があった。第4章と第5章で確立したAUCを基盤とした品質評価結果に基づいたフィードバックを通して、ラボスケールでの高純度FP試料を調製できるようになった。ここでは、同一のコンストラクトを有する10個の高純度AAV8ベクターを対象として、14項目にわたるQAの変動を評価し、どのQAが生物活性の指標である遺伝子導入効率に影響するのかを調べた。結果、VP2分子の化学量論とVP1の特異領域に存在するアスパラギン残基（N57およびN94）の脱アミド化率が、AAVベクターの遺伝子導入効率に対してそれぞれ有意な正の相関と負の相関を示すことを明らかにした。

本研究は、現代の医療において重要な役割を担う「抗体医薬品」と「AAVベクター」が直面する「分子の不均一性」が生じるメカニズム解明と、「分子の不均一性」の評価方法の確立に取り組んだものである。本研究で示した取り組みは、より安全で有効なバイオ医薬品を創出するための学術基盤の構築を通して、今後ますます多様化・複雑化するバイオ医薬品の研究開発を加速させることでバイオテクノロジー産業の発展に貢献するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (丸 野 孝 浩)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 内 山 進
	副 査	教授 大 政 健 史
	副 査	教授 渡 邊 肇

論文審査の結果の要旨

バイオ医薬品は抗体医薬品や遺伝子治療用ベクターなどを含み、高い治療効果を示す一方で、その構造の複雑性により生じる分子の不均一性が品質変動や安全性の低下に直結することが知られている。抗体医薬品では、特にマイクロメートルサイズの凝集体（ミクロン凝集体）による免疫原性の誘発が重大な課題である。遺伝子治療用アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターでは治療用遺伝子を含まない空粒子（EP）の混在やカプシドタンパク質の翻訳後修飾が生物活性に影響する。本研究はこれら二つに共通する「分子の不均一性」に焦点を当て、様々な分析技術を駆使した品質評価を通じてその根本原因を分子レベルで解明すること、ならびに信頼性の高い品質評価法を確立することで、バイオ医薬品開発の科学的基盤を構築することを目的としている。

本論文の前半では、まず初めに、近年、臨床での使用が拡大しているプレフィルドシリンジの使用時における抗体医薬品の凝集体形成メカニズムを明らかにしている。シリンジから薬液を「押出す」ことで調製された試料中のミクロン凝集体濃度は、「静かに抜き取る」場合に比べて、試験した3種類全ての抗体医薬品において大幅に増加することを示している。シリンジ内表面への吸着量の定量結果と併せて考察した結果、この現象は、プランジャーヘッドがシリンジ内壁を物理的に掃き出す際に、バレル表面に吸着していたタンパク質が剥離し、ミクロン凝集体として溶液中に放出されることが原因である可能性が示されている。これらの知見は、抗体医薬品と投与デバイス表面との界面相互作用が凝集形成の要因であり、バレル材料や表面処理の選択がプレフィルドシリンジ製剤の安全性向上に直結することを示している。

次に、分析過程における機械的ストレスを介した凝集形成メカニズムの解明を行っている。等温滴定型熱量計測定は、熱力学に基づいた分子間相互作用解析の手法である。抗体医薬品の品質評価においては、抗原やFc受容体との相互作用の定量的評価に広く利用される。一方で測定中の滴定シリンジによる混合を目的とした攪拌操作が分析対象のタンパク質の安定性に影響を与え、決定される熱力学パラメータの信頼性を損なう可能性が指摘されている。ここでは、モデルタンパク質を用いて、攪拌条件が結合の熱力学パラメータに与える影響を評価している。結果、高い攪拌回転数では、全タンパク質分子における結合に関与できない画分の割合の有意な増加、ミクロン凝集体の増加およびタンパク質のアンフォールディングが確認されている。攪拌回転数を高くすることによる結合に関与できない画分の割合の増加はモデルタンパク質に限らず、抗体医薬品と抗原ペプチドの相互作用でも確認されている。

本論文の後半では、AAVベクター試料の品質管理において課題とされている、空粒子-完全粒子比（目的の治療用遺伝子を含む完全粒子（FP）とEPの比）を決定する方法の確立を超遠心分析沈降速度法により行っている。加えて、製造量が 1×10^{12} vg（ベクターゲノム）に満たない小スケール製造を基盤とした製造工程の最適化を目指す段階などにおいても空粒子-完全粒子比を決定できる方法を超遠心分析バンド沈降速度法により確立している。最後にAAVベクターの製造工程における品質特性（QA）の変動とその生物活性への影響評価を行っている。AAVベクター試料中に含まれるEPは生物活性に影響を与えることから、AAVベクターのQAの変動と生物活性の関係を調べるには高純度のFP試料を準備する必要がある。本論文で確立した超遠心分析を基盤とした品質評価結果に基づいたフィードバックを通して、ラボスケールでの高純度FP試料を調製できるようになった。ここでは、同一のコンストラクトを有する10

個の高純度AAV8ベクターを対象として、14項目にわたるQAの変動を評価し、どのQAが生物活性の指標である遺伝子導入効率に影響するのかを調べた。結果、VP2分子の化学量論とVP1の特異領域に存在するアスパラギン残基（N57およびN94）の脱アミド化率が、AAVベクターの遺伝子導入効率に対してそれぞれ有意な正の相関と負の相関を示すことを明らかにしている。

以上のように、本論文は、現代の医療において重要な役割を担う「抗体医薬品」と「AAVベクター」が直面する「分子の不均一性」が生じるメカニズム解明と、「分子の不均一性」の評価方法の確立に取り組んだものである。本論文で示した取り組みは、より安全で有効なバイオ医薬品を創出するための学術基盤の構築を通して、今後ますます多様化・複雑化するバイオ医薬品の研究開発を加速させることでバイオテクノロジー産業の発展に貢献するものと考えられることから、本論文は博士論文として価値あるものと認める。