



Title	PEG化蛋白質の品質評価・保証に関する基礎研究
Author(s)	中島, 崇樹
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87992
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 (中島 崇樹)	
論文題名	P E G 化蛋白質の品質評価・保証に関する基礎研究
論文内容の要旨 肝炎治療において、インターフェロン製剤の開発がブレイクスルーとなったように、切れ味鋭い活性を有する蛋白質医薬が台頭したことで、肝炎以外にも、がんや自己免疫疾患といった難治性疾患の治療効果が向上している。蛋白質医薬は、その開発の初期には生体内安定性の乏しさが懸念されていたものの、ポリエチレングリコール (PEG) によるバイオコンジュゲーションが契機となり、現在では数多くの蛋白質医薬が臨床応用されている。その一方で、蛋白質医薬自体は、バイオコンジュゲーションの有無にかかわらず、低分子医薬と比較して、熱や落下といった物理化学的ストレスに不安定であることが知られている。特に、アンプルやバイアルといった従来の容器に加えて、最近ではプレフィルドシリンジも汎用されている現在、これら製剤中の蛋白質医薬は、溶液状態で輸送されるため、落下や振動といったストレスを受けやすく、蛋白質由来の凝集体や、シリンジ内壁に塗布されているシリコンオイル由来の微粒子が容器中で形成される可能性が報告されている。さらに、シリコンオイルと抗体の複合体として形成された微粒子は、炎症性サイトカインの産生の促進やFcγ受容体の活性化などの応答を引き起こすことが報告されており、蛋白質の物理的特性の変化が生体応答の変化につながる可能性があることを示している。そのうえで、ペギネサチド (PEG 修飾エリスロポエチン受容体作動性ペプチド) 製剤では、実際にアナフィラキシーが発現し、製品の回収に至っている。その後の解析から、バイアル中で多くの微粒子が検出され、それらがアナフィラキシー誘発に関与した可能性も提示されている。したがって、これまで以上に、蛋白質医薬中の微粒子の管理の重要性が高まっており、微粒子形成の要因の一つとして、輸送時の品質管理が重要となっている。しかしながら、PEGによる蛋白質のバイオコンジュゲーションに関する研究はこれまで、被修飾体の抗原性や免疫原性の低減など、PEGの有用性追求を目的とした解析がほとんどで、PEGの長さや修飾数などを变化させた際の血中半減期の変動などが評価されてきたに過ぎない。本観点から、蛋白質医薬の輸送時の品質担保を目指し、PEG化蛋白質医薬の活性が損なわれることなく、患者に有害反応も引き起こさないためには、落下ストレス下におけるPEG化蛋白質の物性や動態、生体応答に関する体系的理解が求められている。特に、現状、市販および臨床開発されているPEG化蛋白質医薬では、種々の生理活性蛋白質に対して、様々な分子量および数のPEGが使用されているため、これらPEG化の違いが与える影響も踏まえて評価する必要がある。そこで本研究では、Ovalbumin (OVA) をモデルに、PEGの分子量や修飾頻度の異なるPEG化OVA (PEG-OVA) を作製し、落下ストレスを与えた際の「物性」、「動態」、「生体応答」の変化を追究することで、高品質なPEG化蛋白質医薬の開発や、輸送法の提言に向けた情報の収集を試みた。具体的には、PEGの分子量や修飾頻度の異なるPEG-OVAに落下ストレスを負荷したうえで、物性変化の指標として、シリンジ内の微粒子形成を解析した。さらに、動態・生体応答変化の指標として、PEG-OVAをマウスに投与した際の抗PEG抗体の産生およびPEG-OVAの排泄を評価し、微粒子形成の程度と比較した。 まず、5 kDaと20 kDaのPEG-NHSを異なるモル比でOVAと反応させ、PEGの分子量および修飾頻度の異なる4種のPEG-OVAを作製し、サイズ排除クロマトグラフィーで精製した。また、作製したPEG-OVAをマウスに尾静脈内投与したところ、既存の報告同様、PEGの分子量が大きく、修飾頻度が高いPEG-OVAで血中半減期が長かったことから、動態学的観点からも、PEGを適切に修飾できていることを確認した。そこで、各種PEG-OVAに落下ストレスを負荷し、フローイメージング法により微粒子数を定量したところ、各PEG-OVA溶液中で蛋白質由来やシリコンオイル由来の微粒子が観察された。また、その微粒子数は、大きなPEGを修飾したOVAほど、多くなることが示された。次に、微粒子形成が多く認められた20 kDa PEG-OVAをマウスに尾静脈内投与し、抗体産生を評価した。その結果、まず、落下ストレス負荷の有無にかかわらず、PEGの修飾頻度が高い20 kDa PEG-OVA投与群では、修飾頻度が低いPEG-OVA投与群に比較して、血中の抗PEG抗体量が増加した。そのうえで、落下ストレスを負荷した群では、負荷していない群に比較して、抗PEG抗体の産生が顕著に高くなることが示された。抗PEG抗体の産生によって、次回投与時の排泄が促進されること (Accelerated Blood Clearance : ABC現象) が知られているため、最後に、20 kDa PEG-OVAをマウスに反復投与した際のPEG-OVAの排泄の程度を比較解析した。まず、PEGの修飾頻度が低い20 kDa PEG-OVA投与群について、1回目に落下ストレスを負荷	

していないPEG-OVAを投与した場合、2回目投与後の血清中PEG-OVA濃度は、単回投与群と比較して変化は認められなかった。その一方で、1回目に落下ストレスを負荷したPEG-OVAを投与した群では、2回目投与後の血清中PEG-OVA濃度は、単回投与群と比較して有意に低下し、落下ストレスを負荷することで排泄が促進されることが示唆された。また、PEGの修飾頻度が高い20 kDa PEG-OVA投与群については、1回目に落下ストレスを負荷したPEG-OVAの投与群のみならず、1回目に落下ストレスを負荷していないPEG-OVAの投与群においても、2回目投与後の血清中PEG-OVA濃度は、本実験系で検出できないほど低下した。これらの成果は、抗PEG抗体産生のプロファイルと相関していることから、1回目の投与で誘導された抗PEG抗体に依存して、PEG-OVAが排泄されている可能性が示された。

以上、本研究は、OVAをモデルとした基礎研究ではあるものの、PEG-OVAが落下ストレスを受けることにより、PEGの分子量や修飾頻度に応じて、微粒子形成・抗PEG抗体産生・ABC現象が起こりうることを提起した。今後、本研究が基盤となって、実用化されている蛋白質を含めて様々な蛋白質に適用されることで、PEG化蛋白質の適切なPEG修飾の理解や、PEG化蛋白質医薬品の輸送条件の設定など、適切な品質管理・保証につながることを期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (中 島 崇 樹)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 堤 康央
	副 査 教授 近藤 昌夫
	副 査 教授 石井 明子

論文審査の結果の要旨

本研究では、ポリエチレングリコール修飾蛋白質（PEG化蛋白質）の輸送中の品質管理・保証を目指し、医薬品の輸送時に負荷される可能性のある、落下ストレス等の物理的ストレスが、PEGの分子量や修飾頻度が異なるPEG-OVA（PEG化卵白アルブミン<オボアルブミン>）に与える影響について、物性変化（微粒子形成）と動態・生体応答変化（抗PEG抗体の産生とPEG-OVAの排泄促進）の観点から解析し、以下の学位論文に相応しい重要知見を得た。

1. OVA・PEG-OVAに落下ストレスを負荷することで、微粒子が形成され、PEGの分子量が大きくなるほど、その微粒子数は多くなることが示唆された。
2. 微粒子が多く形成された20 kDa PEG-OVA (S)*と(L)**では、落下ストレスによって、修飾頻度が高いほど抗PEG抗体が産生され、排泄が促進された。
*S ; PEG修飾率_小・分子量_小 **L ; PEG修飾率_大・分子量_大
3. 抗PEG抗体の産生や20 kDa PEG-OVAの排泄の促進には、落下ストレスによって形成された微粒子をマクロファージが取り込みやすかったことが一因である可能性を示した。

上記のように、PEG化蛋白質の開発や輸送における品質評価・保証に関する基礎的知見であり、本研究が基盤となることで、将来的には、PEG化蛋白質の適切なPEG修飾の理解や、PEG化蛋白質医薬品の輸送条件の設定など、適切な品質管理・保証につながり、医療の質が高まることが期待される。

以上より、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。