

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01393

研究課題名（和文）抗原の機能分離設計と免疫応答・寛容制御

研究課題名（英文）Rational design of poly(ethylene glycol) derivatives for reduction of antibody responses against poly(ethylene glycol)

研究代表者

白石 貢一（Shiraishi, Koichi）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40426284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：ポリエチレングリコール（PEG）に対するPEG特異抗体はPEGによって誘導される抗体であるが、PEG自身に特異的に結合はされない。このPEG特異抗体の結合はPEG誘導体に疎水性部が存在すると、その非特異的相互作用を効果的に利用し、結合を示す。一方、PEG鎖に親水性アニオンが存在するとPEG特異抗体との結合が起こりにくいことを見出した。PEG特異抗体との結合を抑制する親水性アニオンを中間種にもつトリブロックコポリマーを作製し、PEGに対する免疫原性を評価した。中間種としてのポリアニオン鎖長に依存してPEGに対する免疫原性は異なり、十分なポリアニオン鎖長が免疫原性を低減させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリエチレングリコール（PEG）は汎用性の高い高分子である。特に、医薬品としてのPEGはその水和効果によって、タンパク質やドラッグキャリアの血中半減期の向上やタンパク質の免疫原性の低減など、医薬品にとってのPEG化はゴールドスタンダードであり、非常に有効な手段であることが知られている。しかしながら、近年、PEGに対する抗体（PEG特異抗体）が薬物キャリアによって産生されることが知られている。本研究は、PEGを用いながらPEGに対する特異抗体が抑制される新たなPEG分子を設計し、作製されたPEG分子を有する薬物キャリアが免疫原性を低減することを立証した。

研究成果の概要（英文）：Poly(ethylene glycol) is one of the most useful synthetic polymers for biopharmaceutics. As well as protein PEGylation, nano-sized drug carriers (nanomedicines) use PEG for surface coverages to escape bindings from serum proteins. As a result of PEGylation on the surfaces, PEGylated nanomedicines exhibit long blood circulation characteristics. However, IgM antibodies against PEG (anti-PEG IgM) have been found in PEGylated nanomedicine, such as PEG-liposome- and PEGylated micelle-injected animals. We have found that anti-PEG IgM does not bind to the PEG chain, but bind to PEG-conjugates. This unique characteristic of anti-PEG antibodies may be a key to suppress antibody responses against PEG, therefore, we synthesized a series of new PEG-triblock copolymer possessing polyanion between a PEG and a hydrophobic block to reduce anti-PEG Ab responses. Reduction of anti-PEG Ab responses have been observed in a polyanion-chain-length dependent manner.

研究分野：高分子化学

キーワード：ポリエチレングリコール 免疫原性 特異IgM抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬物キャリアの一つである高分子ミセルは大きさ 10-100nm であり、内核と外殻という異なる性質を示す 2 層構造を有している。一般に、内核層には治療薬から診断薬といった様々な薬物封入が可能であり、かつ薬物は外界との相互作用を親水性外殻によって守られている。この 2 つの異なる性質によって封入された薬物の薬物動態は適切に制御されている。薬物キャリアの特徴は親水性外殻の性質に依存するところが大きく、一般には生体親和性に優れたポリエチレングリコール (PEG) が用いられている。PEG は水溶性が高く、かつ有機溶媒にも溶けることから、取り扱いが容易である。また、生体親和性に優れ、無毒であることが知られており、多くの医薬品・食品等に用いられている。PEG 化されたたんぱく質は、そのたんぱく質の免疫原性が非常に低減されることから、現在、10 種以上の PEG 化たんぱく質製剤が認可されている。一方で、PEG を用いたことで PEG に対する免疫応答の問題が、近年、注目されるようになってきた。元々、PEG は免疫原性が低く、無毒であることから使用されていたにも関わらず、PEG に対する抗 PEG 抗体産生が報告されたためである。

(2) 申請者らは PEG に対する抗体 (抗 PEG 抗体) が PEG 鎖に強く結合することができない抗体であることを報告していた。即ち、抗 PEG 抗体は、PEG 誘導体の投与によって抗体価があがる抗体として PEG 特異的でありながら、PEG 鎖に結合しない抗体であるため、PEG は、一般に言われる、抗原としての性質を示さない。この一見、合判する性質は、

- 1) PEG 鎖自身には強い相互作用を示す化学構造がないこと、
 - 2) 反発する性質 (荷電、立体障害) も少ないこと、
- の 2 つの性質によって互いの分子同士が容易に近づくことのできる性質を PEG が示し、加えて、
- 3) PEG 脂質のように、PEG 近傍に脂質のような非特異的に強く働く疎水性相互作用を利用してしまうこと

以上の点を明らかにしてきた。このような非特異的相互作用が生体中において利用されることを理解すれば、PEG を介した結合を抑える分子設計により、抗 PEG 抗体を産生させない PEG 薬物キャリアが達成されると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記に示したように、PEG の免疫原性は PEG による「特異性」とその近傍の「結合性」部分によって成立する。即ち、PEG の免疫原性からみれば、いわゆる抗原の本質的な意味は「特異性」と「結合性」の両要素が近傍に存在することにある。この 2 つの要素により免疫応答・抑制が決定されるという概念に基づき、本研究は新たな PEG-ブロック共重合体を提案し、PEG 免疫応答の抑制制御を行う。即ち、PEG-ブロック共重合体の「特異性」と「結合性」の距離的解離を基盤とし、PEG に対する免疫原性を抑制を検討する。これにより PEG 免疫原性問題の根本的解決を目的とし、PEG 製剤開発に大きく貢献する。

3. 研究の方法

1) 新たな PEG-ブロック共重合体の合成

始めに、PEG-NH₂ を高分子重合開始剤として鎖長が制御された 3 種類のブロックコポリマー PEG-*b*-poly(benzyl L-aspartate) block copolymer (PEG-PBLA) を合成した。重合の際に、BLA 鎖を 10~90 の間で 3 段階合成することを目指し、重合を行った。重合後、再沈殿精製から得られた白色粉末を ¹H NMR にて構造解析を行い、重合度を決定した。次に、得られた PEG-PBLA の末端 NH₂ から再重合を行い、PEG-PBLA-*b*-poly(L-phenylalanine) (PEG-PBLA-PPhe) を合成した。フェニルアラニンは疎水性が高いため、トリブロック共重合体の水溶性を考慮して、重合数を 15~50 に設定し、重合を行った。PEG-PBLA と同様に、¹H NMR にて構造解析を行い、重合度を決定した。得られたトリブロック共重合体をアルカリ存在下において、PBLA ユニットの加水分解を行い、PEG-*b*-poly(aspartic acid)-*b*-P(Phe) (PEG-P(Asp)-PPhe) を合成した。完全な加水分解の進行を重 DMSO 中の ¹H NMR にて確認し、構造、及び重合数を決定した。得られた 3 種類の PEG-P(Asp)-PPhe は生理食塩水中で自己会合させミセル化し、その会合挙動を動的光散乱法 (DLS) によって評価した。

2) PEG-ブロック共重合体の生体安定性評価

3 種類の得られた PEG-P(Asp)-PPhe のアスパラギン鎖の一部のカルボキシル基を活性化し、AlexaFluor647 にて蛍光標識化し、PEG-P(Asp)-PPhe-Alexa647 を作製し、自己会合を形成させた AlexaFluor647 標識化ミセルを作製した。作製した PEG-P(Asp)-PPhe-Alexa647 ミセルをマウス尾静脈より投与し、0 24 時間まで経時的に採血を行い、血液中の PEG-P(Asp)-PPhe-Alexa647 濃度を評価した。

3) PEG-ブロック共重合体の免疫原性評価

得られた 3 種類の PEG-P(Asp)-P(Phe) を各投与量 (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 mg/kg, n=3) にてマウス尾静脈より投与し、7 日後に採血をし、得られた血清中の IgM 抗体を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法によって評価した。3 種の PEG-P(Asp)-PPhe とともに、ポジティブコ

ントロールとして抗 PEG IgM 抗体産生の最適化がなされている P(Asp)鎖を有さない PEG-PBLA を用いた。ELISA においては PEG-PBLA をプレート上にコーティングし、コートされた PEG 上への抗体結合を確認する直接法によって評価を行った。

4. 研究成果

1) PEG-ブロック共重合体の合成結果、及び水中会合挙動の評価

得られた 3 種類の PEG-P(Asp)-P(Phe)を生理食塩水中で自己会合させ、その会合挙動を動的光散乱法(DLS)によって評価した。表 1 に示すように、疎水性の高いフェニルアラニンの重合度が高くなることで、粒子サイズは大きくなる傾向が得られた。

表 1. PEG-P(Asp)-P(Phe)の各重合度と会合における粒子サイズ

Run	ポリマー	Asp 鎖 /N	Phe 鎖 /N	粒子サイズ /nm
1	PEG-P(Asp)-PPhe	13	17	60
2	PEG-P(Asp)-PPhe	39	32	103
3	PEG-P(Asp)-PPhe	87	43	118
Ref	PEG-PBLA	0	31 (BLA 鎖)	90

2) PEG-ブロック共重合体の血液中安定評価及び AUC

3 種類の PEG-P(Asp)-P(Phe)の血液中における安定性評価を行った。Run1 から Run3 における 3 種類ともに PEG の効果による長期滞留性を示した (図 1)。血中濃度の経時変化から得られた AUC の比較を行った (図 2)。その結果、Run1 が最も安定に存在できることが明らかとなったが、Run2、Run3 も十分に長い血中滞留性を示した。これまでに、PEG の免疫原性が示された PEG-疎水性ブロックコポリマーからなる高分子ミセル (1600 µg/mLhr) と同等の AUC であった。

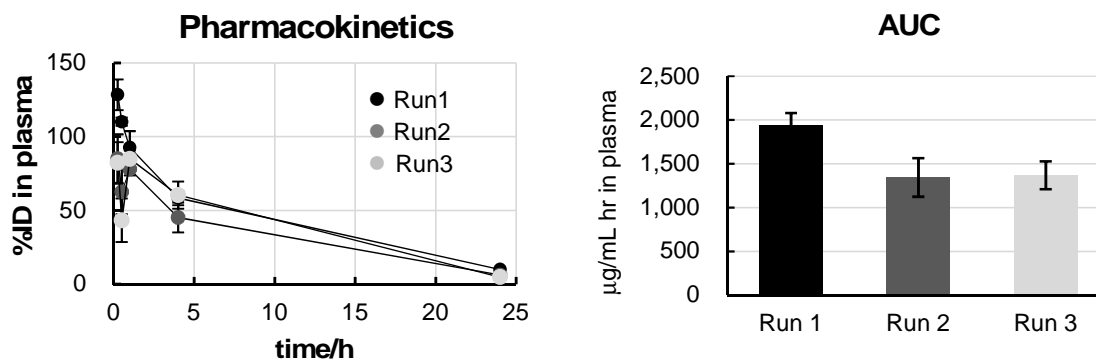


図 1 PEG-P(Asp)-P(Phe)の血中濃度の変化

図 2 PEG-P(Asp)-P(Phe)の AUC

2) PEG-ブロック共重合体の免疫原性評価

3 種類の PEG-P(Asp)-P(Phe)を各投与量 (0.001, 0.01, 0.1, 1.0 mg/kg, n=3) にて得られた血清中の抗 PEG IgM 抗体を ELISA にて評価した。抗 PEG IgM 抗体産生に最適化しており、ポジティブコントロールとして用いた PEG-PBLA は 0.01mg/kg で投与した。3 種の PEG-P(Asp)-P(Phe)において、抗 PEG IgM 抗体産生に P(Asp)鎖の影響が現れた。即ち、P(Asp)鎖長の観点からすれば、ポジティブコントロールとして用いた PEG-PBLA は P(Asp)鎖長がなく、免疫原性が最も高く顕著に抗 PEG IgM 抗体を産生し、次に、P(Asp)鎖が 13 ユニットと短い鎖長を有する PEG-P(Asp)-PPhe はわずかに低い免疫原性を示す傾向にみえるが同等といえる。一方、P(Asp)鎖を長くした 39、87 ユニット有する PEG-P(Asp)-PPhe は今回の投与範囲において、抗 PEG IgM 抗体産生が十分低く抑えられていることが明らかとなった。

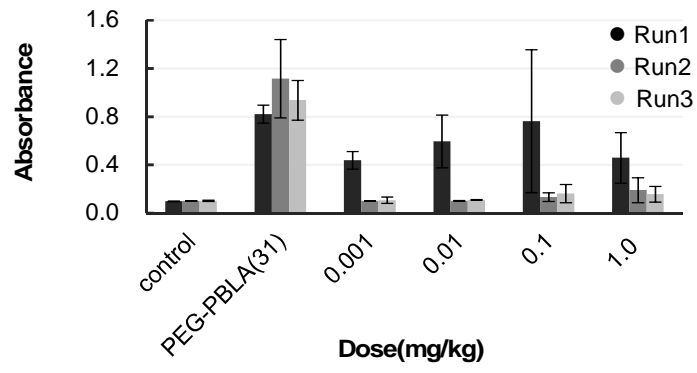


図3 PEG-P(Asp)-P(Phe)の抗PEG IgM抗体産生評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiraishi Kouichi, Yokoyama Masayuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Toxicity and immunogenicity concerns related to PEGylated-micelle carrier systems: a review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science and Technology of Advanced Materials	6. 最初と最後の頁 324 ~ 336
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14686996.2019.1590126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白石貢一、横山昌幸
2. 発表標題 Polyethylene glycol に対する免疫原生の抑制法の検討
3. 学会等名 第13回日本分子イメージング学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kouichi Shiraishi, Masayuki Yokoyama
2. 発表標題 Evaluation of Hydrophobic Conjugate-dependent PEG-related Antibody Responses
3. 学会等名 Controlled Release Society Annual Meeting and Exposition
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白石貢一
2. 発表標題 PEGに対する抗体産生と抑制に関する研究
3. 学会等名 日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白石貢一
2. 発表標題 PEGの免疫原性
3. 学会等名 第68回医用高分子研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白石貢一、横山昌幸
2. 発表標題 PEG特異的相互作用に関する考察
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白石貢一、横山昌幸
2. 発表標題 逡巡するPEG
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shiraishi Kouichi Yokoyama Masayuki	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer, Singapore	5. 総ページ数 24
3. 書名 Clinical Diagnostic Imaging	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

