

令和 3 年 10 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01395

研究課題名(和文) レシチンの化学修飾により体内分布を制御した改良型バイオ医薬(バイオベター)の開発

研究課題名(英文) Development of lecithin-modified therapeutic proteins as biobetters

研究代表者

石原 務 (Ishihara, Tsutomu)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：70349554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質をレシチンで化学修飾した改良型バイオ医薬品(バイオベター)の開発を行った。タンパク質としては、ライソゾーム酵素あるいはIgG抗体を用い、その活性や培養細胞との相互作用を解析しその有用性の評価を試みた。レシチン修飾したライソゾーム酵素は細胞毒性が低く、血漿タンパク質と複合体を形成した。また、非修飾体に比べ細胞に顕著に取り込まれ、細胞内で高い酵素活性を示すことが明らかになった。一方抗体では、有機溶媒混合比を低めることで抗原認識性を維持したレシチン修飾体を合成できることがわかった。このレシチン修飾抗体は、非修飾体よりも顕著に細胞に取り込まれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質を有効成分とするバイオ医薬の開発は近年劇的に進展しており、今後の薬物療法の主流となることは疑いない。しかし、タンパク質の生物活性の強さと実際の薬理効果は必ずしも相関せず、その活性を最大限に引き出すには、体内動態を制御することが求められる。本研究では、レシチン修飾という基幹技術により、活性を維持しつつタンパク質の細胞内への移行性を高められることを明らかにした。この成果は、バイオ医薬の有用性を飛躍的に拡大できる可能性を秘める。

研究成果の概要(英文)：We have attempted to develop lecithin-modified proteins as improved therapeutic proteins (biobetters). Lysosome enzyme or IgG antibody was used as the protein, and its activity and interaction with cultured cells were analyzed. The lecithinized lysosomal enzyme had low cytotoxicity and formed a complex with plasma proteins. Furthermore, the enzyme was internalized in the cells, and showed high enzymatic activity. On the other hand, it was found that the lecithinized antibody can maintain the antigen-binding activity by reducing the amount of organic solvent during the synthetic reaction. This lecithinized antibody was more internalized in the cells than the unmodified antibody.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：バイオベター レシチン DDS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質を有効成分とするバイオ医薬の研究開発は目覚ましい進歩を遂げており、今後の医療産業の発展に大いに資する。しかし、タンパク質の生物活性の強さと実際の薬理効果は必ずしも相関しない。タンパク質が本来有する活性を最大限に引き出すには、生体内で適切なタイミングで適切な場所に配す、つまり体内分布を制御することが重要である。また、バイオ医薬の開発には莫大なコストを要し、国および患者の医療費の高騰を招く。このような背景から、昨今バイオベター(バイオ医薬の改良品)やバイオシミラー(バイオ医薬の後続品)の開発に注目が集まる。特に、改良により敢えて既存品と差別化を図るバイオベターは薬理効果及び製造コストの両面で大きなメリットを有すると考えられる。

バイオベターは、タンパク質に遺伝子工学的改変あるいは化学的修飾を施すことで作製されてきた。しかし、遺伝子工学的手法では改良の余地が少なく、特に抗体医薬では既存品との明確な優位性を示せず特許取得も難しい。一方、化学的修飾では、より劇的に体内分布変化や薬理効果の増強を図ることが可能である。代表的な基盤技術のポリエチレングリコール(PEG)による化学修飾では、修飾体の血中半減期の延長とそれに伴う薬理効果の増強が認められ、未修飾の先発品の市場を受け継ぐことに成功している。しかしながら、PEG 修飾では、細胞や組織への親和性は低下してしまう。

2. 研究の目的

我々は、これまでに脂質であるレシチン(フォスファチジルコリン,PC)をタンパク質に共有結合する独自の修飾技術を確立してきた。このレシチン修飾によりタンパク質の体内分布は大きく変化する。我々は、そのメカニズムが血漿タンパク質との結合による血中滞留性の増大と細胞膜への結合による細胞親和性の向上であることを報告してきた(文献1)。また、この細胞親和性の向上が薬理効果を増幅する主要因であることも明らかにした(文献2)。活性酸素を除去する生体酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)をレシチン修飾した PC-SOD は、特発性肺線維症や潰瘍性大腸炎など様々な疾患の動物モデルで顕著に高い薬理効果を示すことが知られる。これらの結果は、レシチン修飾技術がバイオベターを作製するのに有用であることを強く示唆する。しかし、既存バイオ医薬(タンパク質)の薬理作用は様々であり、この技術に基づく体内動態変化が薬理効果の増強に結びつく医薬品は限られる。

そこで、我々は、既存バイオ医薬を網羅的に探索し、これまで得られた知見から本技術を応用展開するのに適したタンパク質としてライソゾーム酵素と IgG 抗体を選定するに至った。本研究では、この二剤のバイオベターを作製し基礎データを取得することを目的とした。

3. 研究の方法

これまで構築してきたタンパク質へのレシチン修飾技術をベースに、バイオベターの候補製剤を作製しその有用性を評価した。タンパク質としてはライソゾーム酵素と IgG 抗体を用いた。修飾率が異なるレシチン修飾タンパク質を合成し、順次三つのステージ(タンパク質の活性評価と修飾率分析、培養細胞との親和性や細胞内分布、血漿タンパク質や血球細胞との相互作用、細胞毒性、培養細胞での活性)により評価することで、最適な製剤候補のスクリーニングを実施した。

4. 研究成果

(1) レシチンを修飾したタンパク質は、既報の方法に従い合成した。タンパク質を溶解したリン酸緩衝液に、活性エステルを有するレシチン誘導体(APC)を溶解した有機溶媒を徐添加し、室温で2時間反応させた。その際、APCとタンパク質の混合重量比や有機溶媒の種類、緩衝液と有機溶媒の混合比などを様々に変え合成した。

はじめにライソゾーム酵素のレシチン修飾を行った。酵素は化学修飾による失活が懸念されるので、反応時の有機溶媒の種類や量がレシチン修飾率や酵素活性に及ぼす影響を検討した。その結果、イソプロパノールを用いるとこの酵素は凝集し、DMFを用いると失活してしまった。一方、DMSOではその混合比が30%以上では失活したものの25%では活性を維持していた。よって、この酵素では、DMSO混合比25%で反応させるのが適切であることがわかった。実際にこの条件でAPCと反応させた反応物をアガロースゲル電気泳動により分析したところ、酵素に対するAPCの仕込み量に応じてバンド位置が正極側へシフトした。これは、レシチンが酵素表面のアミノ基と結合することで、等電点が低下したためと考えられる。さらに、その活性を測定したところ、APCの仕込み量によらず90%程度の高い活性が維持されていた。

次に、HeLa細胞(ヒト子宮頸がん由来細胞株)およびHUVEC(ヒト臍帯静脈内皮細胞)を用い、レシチン修飾酵素の取り込みを免疫染色により観察した。その結果、どちらの細胞でも非修飾酵素よりもレシチン修飾酵素の方が細胞に多く取り込まれることがわかった。最適なレシチン修飾率を見出すため、様々な修飾率のレシチン修飾体と細胞をインキュベートし、その細胞溶解液に基質を添加し酵素活性を測定した。その結果、いずれのレシチン修飾体も非修飾体より強い活性を示したことから、レシチン修飾体は細胞に多く取り込まれかつ活性が維持されていることが確認できた。また、酵素に対するAPCの仕込み重量比を0.5として合成したレシチン修飾体が、特に強い活性を示した。さらに、細胞内移行性でこの酵素により分解され消光する蛍光基質を用い蛍光顕微鏡観察したところ、非修飾酵素では細胞内の蛍光強度に変化がなかったのに対

し、レシチン修飾酵素では蛍光が消光した。よって、このレシチン修飾酵素は生細胞の中で基質を分解できることが明らかになった。

低温条件下(4℃)でレシチン修飾酵素を HeLa 細胞とインキュベートしたところ、取り込みが抑制された。よって、レシチン修飾酵素は主にエネルギー依存のエンドサイトーシス経路で細胞に取り込まれることがわかった。そこで、様々なエンドサイトーシス阻害剤を添加し取り込みを確認したところ、レシチン修飾酵素はクロロプロマジンと M₁CD で阻害された。よって、レシチン修飾酵素はクラスリン依存のエンドサイトーシス、および脂質ラフトを介したコレステロール依存エンドサイトーシスを介し、細胞に取り込まれていることが示唆された。また、リソソームを染色する LysoTracker Green および、細胞核を染色する Hoechst33258 を用い共染色したところ、レシチン修飾酵素は、主にリソソームに分布していることがわかった。

レシチン修飾した SOD は、血漿タンパク質と複合体を形成することが既に報告されている。複合体を形成することで、見かけ上の分子量が増大し腎臓からの排出が抑制され血中滞留性が向上する。そこで、このレシチン修飾酵素をウシ胎児血清に添加し電気泳動解析したところ、レシチン修飾酵素も何らかの血漿タンパク質と結合していることがわかった。一方で、血清を含む培地中では、レシチン修飾酵素の細胞への取り込みは抑制された。よって、このレシチン修飾酵素は可逆的に血漿タンパク質と複合体を形成し、複合体から遊離した一部のレシチン修飾酵素が細胞に取り込まれると考えられる。

以上より、DMSO 混合比 25%の条件下にて、活性を維持したレシチン修飾ライソゾーム酵素を合成できた。また、このレシチン修飾酵素は非修飾体よりも細胞に多く取り込まれ、生細胞内で強い活性を示した。

(2) 抗体医薬は、現在のバイオ医薬の主流を占める。抗体は標的抗原に特異的に結合できるため治療効果が高いが、一方で細胞内移行性が乏しいため標的は細胞膜上や細胞外の抗原に限定される。よって、抗体医薬が細胞内に移行できれば、その汎用性が著しく高まると期待される。そこで次に、IgG 抗体のレシチン修飾をおこなった。抗体としては、まずモデルとしてグロブリン(- α -グロブリン)を用いた。蛍光色素をラベルしたグロブリンに、上記と同様な方法にてレシチン修飾をおこなった。レシチン修飾グロブリンは非修飾体よりも HeLa 細胞に多く取り込まれ、グロブリンに対する APC の仕込み重量比を 0.5 として合成したレシチン修飾体が最も取り込まれていた。次に細胞骨格に対するモノクローナル抗体 A のレシチン修飾をおこなった。生細胞とレシチン修飾抗体 A をインキュベートし細胞を洗浄固定後、蛍光ラベルした二次抗体で抗体 A を染色した。その結果、非修飾の抗体 A を添加した細胞では全く発色が認められなかったが、レシチン修飾抗体 A では発色していた。しかし、その分布はドット状で細胞骨格は染色されていなかった。この結果は、レシチン修飾抗体 A は細胞内への移行性は増大するが、抗原である細胞骨格とは結合していないことを示唆した。そこで、この抗体 A を通常の細胞の免疫染色の一次抗体として用いたところ、非修飾体では細胞骨格が染色されたのに対しレシチン修飾体では染色されなかった。よって、このレシチン修飾抗体 A は、抗原認識性が失われていることがわかった。その原因として、抗体 A の抗原結合部位近傍にレシチンが結合し立体障害となっていることが考えられた。そこで、抗体 A と抗原ペプチドを結合させたまま、上記と同条件で APC と反応させた。しかし、免疫染色の結果、このレシチン修飾体でも抗原認識性は失われていた。その他の原因として、合成反応時に用いた有機溶媒による抗体 A の変性が考えられた。そこで、抗体 A を様々な有機溶媒混合比の反応液中でインキュベートし通常の免疫染色をおこなった。その結果、低い有機溶媒混合比でインキュベートした抗体 A では、細胞骨格の発色が認められた。よって、有機溶媒混合比を低下させることで抗体 A の抗原認識性が維持できることがわかった。

そこで、低有機溶媒混合比の新たな条件でレシチン修飾抗体 A を合成した。HPLC とアガロースゲル電気泳動解析により、APC の仕込み重量比に応じレシチンが抗体 A に修飾できることが確認できた。また、免疫染色にて細胞骨格の発色が確認できたことから、このレシチン修飾抗体 A は抗原認識性が維持されていることがわかった。さらに、生細胞とインキュベートした後、細胞を固定し二次抗体により染色した。レシチン修飾抗体 A を添加した細胞では非修飾抗体 A を添加した細胞より強く発色していたことから、レシチン修飾により細胞内への移行性が高まることが明らかになった。

以上のように、本研究では独自のレシチン修飾技術により、活性を保ったまま細胞内への移行可能なバイオベクターの開発に成功した。これは臨床応用(上市)へ向けた一つのマイルストーンの達成とみなすことができる。この成果は本技術(修飾法やタンパク質の選定法)によるバイオベクター作製のランドマークとなりえ、芽づる式に様々なバイオベクター開発が促されると期待される。

引用文献

1. Ishihara T, et. al., J. Pharm. Sci. 103: 1987-94. (2014)
2. Ishihara T, et. al., Mol. BioSystems, 12: 274-82. (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宗方泉稀、松本安平、星貴也、澁井美咲、石原務
2. 発表標題 ホスファチジルコリンを化学修飾したタンパク質の合成とその活性評価
3. 学会等名 2019年度化学系学協会東北大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本安平、星貴也、澁井美咲、水島徹、石原務
2. 発表標題 ホスファチジルコリンを化学修飾したタンパク質の合成とその活性評価
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------