

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15537

研究課題名（和文）補体活性化に着目したバイオ医薬品の凝集体特性と安全性との関連

研究課題名（英文）Relationship between physicochemical properties of protein aggregates and complement activation on safety of biopharmaceuticals

研究代表者

柴田 寛子 (Shibata, Hiroko)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長

研究者番号：60462769

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：蛋白質凝集体の形状や電荷など物理化学的な特性と補体活性化との関連を明らかにすることを最終目的に、凝集体調製方法の確立、補体活性化の評価方法の確立を行い、凝集体特性と活性化能との関連の解明を試みた。静注用免疫グロブリン製剤（IVIg）やアルブミンなどについて、温度や攪拌速度を調整することで特性の異なる凝集体を安定して調製可能な調製方法を確立した。調製した凝集体について、補体活性化能を評価したところ、アルブミンやFc部分が変性したIVIgやアルブミンでも、補体経路が活性化される可能性が示された。ただし、活性化の評価系については、血清及びの処理方法など、さらなる最適化が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体以外のタンパク質やFc部分が変性した抗体においても、凝集体が形成されることで補体経路が活性化される可能性が示され、バイオ医薬品における凝集体の管理の重要性を支持する成果である。また、抗体以外のタンパク質の凝集体の補体活性化能に関する報告は極めて少なく、学術的な意義もあると考えられる。引き続き研究を進め、補体活性化の強度や形状による活性化能の違いについて一貫した傾向が得られれば、バイオ医薬品製剤の適切なリスク管理戦略を構築するのに有益な情報となり、バイオ医薬品の品質管理の近代化および安全性向上につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to establish preparative method of protein aggregates with various physicochemical attributes, complement activation assay, and to elucidate the relationship between physicochemical attributes of protein aggregates and their complement activation potency. A preparative method that can constantly provide protein aggregate with various attributes was developed by varying temperature and agitation rate on IVIg and human albumin. Complement activation potency was evaluated by measuring SC5b9, which is an ultimate product of complement pathway. It was suggested that denatured IVIg and aggregated albumin could activate a complement pathway. In the future, improvement of complement activation assay will be needed to get a consistent relationship between attributes of protein aggregates and complement activation potency.

研究分野：バイオ医薬品

キーワード：バイオ医薬品 補体 凝集体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体などバイオ医薬品に含まれるタンパク質の「凝集体」は、免疫細胞の活性化や補体活性化を介して免疫原性など有害事象を引き起こすリスク因子の一つと考えられている。抗体医薬品の場合、多量体化した抗体の Fc 領域に C1q が結合することで補体活性化が起こると考えられるが、不溶性の凝集体でも補体活性化が起こるのか、抗体以外のバイオ医薬品でも補体活性化が起こるのか、どのような特性(電荷や形状)の凝集体が補体活性化を引き起こすのか、さらにどのような経路で活性化されるのか明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、凝集体の形状や電荷など物理化学的な特性と補体活性化との関連を明らかにすることを最終的に、形状などの特性の異なる凝集体を安定して作製可能な調製方法を確認すること、補体活性化の評価方法を確認し、凝集体の特性と活性化能との関連の解明を目指した。

3. 研究の方法

モデルタンパク質として、ヒトアルブミンや静注用免疫グロブリン製剤(IVIG)、抗体医薬品を用い、以下の項目を検討した。

- (1) モデルタンパク質製剤からの凝集体の分離方法を確認する
- (2) 補体活性化の評価方法を確認する
- (3) 特性の異なる凝集体について補体活性化能を測定する
- (4) " 補体成分および補体制御因子との相互作用を解析する

4. 研究成果

抗体医薬品の場合、多量体化した抗体の Fc 領域に C1q が結合することで補体活性化が起こると考えられるが、不溶性の凝集体でも補体活性化が起こるのか、また抗体以外のバイオ医薬品でも補体活性化が起こるのか明らかになっていない。そこでモデルタンパク質製剤として、静注用免疫グロブリン製剤(IVIG)、インフリキシマブおよびアルブミンに対し、加熱や攪拌など物理化学的な刺激を加えることで特性の異なる凝集体の調製を試みた。フローイメージング法により形成された凝集体の形状および濃度を測定したところ、加熱及び攪拌条件を詳細に検討することで、形状や透明度の異なる凝集体が得られることが分かり、少なくとも IVIG については形状の異なる凝集体を安定して調製可能な調製方法を確認した。ただし、タンパク質の種類によって、凝集体が形成されやすい条件や、凝集体の形状も異なる傾向が見られた。

凝集体による補体活性化の評価方法は、まず補体活性化による最終成分である SC5b9 を測定することとした。補体活性化には3つの経路が知られているが、いずれの経路で活性化されたとしても SC5b9 が形成されるためである。凝集体調製条件を検討したモデルタンパク質製剤について、血清及び血漿と反応させ、SC5b9 の生成量を ELISA により測定したところ、70 以上で加熱し、抗体の Fc 部分を変性した IVIG 試料においても、SC5b9 が形成され補体経路が活性化される可能性が示された。アルブミンについても凝集体によって補体経路が活性化される現象が認められた。ただし、補体活性化の強度や形状による活性化能の違いについては一貫した傾向は得られておらず、血清及び血漿ロットや血漿の処理方法などの、さらなる最適化が必要と考えられた。その他、補体系の主成分である C3 転換酵素活性により C3a 及び C3b の生成も、いずれの補体経路においても誘導されるプロセスであるため、C3a 及び C3b の測定や、凝集体への補体系成

分の結合の測定が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kiyoshi M, Shibata H, Harazono A, Torisu T, Maruno T, Akimaru M, Asano Y, Hirokawa M, Ikemoto K, Itakura Y, Iwura T, Kikitsu A, Kumagai T, Mori N, Murase H, Nishimura H, Oda A, Ogawa T, Ojima T, Okabe S, Saito S, Saitoh S, Suetomo H, Takegami K, Takeuchi M, Yasukawa H, Uchiyama S, Ishii-Watabe A	4. 巻 108
2. 論文標題 Collaborative Study for Analysis of Subvisible Particles Using Flow Imaging and Light Obscuration: Experiences in Japanese Biopharmaceutical Consortium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 832 ~ 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xphs.2018.08.006	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 -

1. 著者名 柴田寛子, 木吉真人, 原園景, 石井明子	4. 巻 49(11)
2. 論文標題 バイオ医薬品における凝集体及び不溶性微粒子評価法について	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 747-753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shibata H
2. 発表標題 Evaluation of Protein Aggregates/Subvisible Particles in Therapeutic Protein Injections.
3. 学会等名 CMC Strategy Forum Japan 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shibata H, Kiyoshi M, Harazono A, Torisu T, Maruno T, Akimaru M, Asano Y, Hirokawa M, Ikemoto K, Itakura Y, Iwura T, Kikitsu A, Kumagai T, Mori N, Murase H, Nishimura H, Oda A, Ogawa T, Ojima T, Okabe S, Saito S, Saitoh S, Suetomo H, Takegami K, Takeuchi M, Yasukawa H, Uchiyama S, Ishii-Watabe A
2. 発表標題 Collaborative study for analysis of subvisible particles using flow imaging and light obscuration: experience in Japanese biopharmaceutical consortium
3. 学会等名 2018 Workshop on Protein Aggregation and Immunogenicity (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko S, Kiyoshi M, Harazono A, Ishii-Watabe A
2. 発表標題 Usefulness and Issues of Flow Imaging Analysis for Evaluating Aggregates in Therapeutic Protein Injections.
3. 学会等名 USP Workshop on Control and Determination of Visible and Sub-visible Particulate Matter in Biologics (国際学会)
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----