

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：32651

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2018～2021

課題番号：17KK0105

研究課題名（和文）抗原の機能分離設計に基づくたんぱく質免疫応答の制御法への展開

研究課題名（英文）Designing PEGylated proteins for reducing PEG-specific immunogenicity

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） 10,800,000円

渡航期間：5.5ヶ月

研究成果の概要（和文）：ポリエチレングリコール（PEG）は生体親和性の高い高分子として知られ、ワクチン脂質ナノ粒子（LNP）にも用いられている。タンパク質製剤へのPEG化はタンパク質製剤の免疫原性を低減させ、安定性向上、半減期の延長など製剤としての治療効率の向上に貢献している。一方、PEGをタンパク質に付加することで、免疫原性が低いと考えられてきたPEGに対して、抗PEG抗体が産生することが知られるようになった。本研究は抗PEG抗体の産生を低減する新たなPEG化手法を見出し、PEG化タンパク質において実証した。

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）は生体親和性の高い高分子として知られ、タンパク質製剤へのPEG化はタンパク質製剤の免疫原性を低減させ、安定性向上、半減期の延長など製剤としての治療効率の向上に貢献している。また、PEG化はmRNAワクチン脂質ナノ粒子にも用いられている。一方、PEGをタンパク質製剤に付加することで、PEGに対する抗体産生が知られるようになり、実際、PEG化製剤において、抗PEG抗体が治療効果が低下させることが報告されている。本研究は抗PEG抗体の産生を低減する新たなPEG化手法を提案し、実践し、特許申請を行った。

研究成果の概要（英文）：PEGs have been known as a bio-inert polymer, and conjugation of PEG on proteins, which is called PEGylation, is the most frequently used method for protein modification. Nowadays, PEG has been used for coverages of lipid nanoparticles for mRNA delivery. PEG reduces proteins' immunogenicity, however, PEG-specific antibodies have been observed in patients, who received repeated injection of PEGylated therapeutics. Therefore, there is the issue that PEG-specific antibodies have been induced after injections of PEGylated therapeutics to be overcome. We have previously suggested a new PEGylation method to reduce PEG-related immunogenicity, and the current study examined the new PEGylation onto proteins. Our suggested PEGylation reduced PEG-related antibody responses, whereas a classic PEGylation exhibited PEG-related antibody responses. Our PEGylation method will be a promising new method for protein modification.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：ポリエチレングリコール 免疫原性 抗PEG抗体

1. 研究開始当初の背景

ポリエチレングリコール (PEG) は生体親和性の高い高分子として知られている。合成高分子である PEG はエチレングリコール (-CH₂CH₂O-) ユニットが直鎖状につながり、単位ユニットあたり 3-4 個の水分子が配位することで、非極性高分子にも関わらず水溶性を示している。PEG 鎖への高い水和性が生体側から排除される作用が非常に低いという性質をもたらす、生体親和性の高い高分子として知られている所以となっている。タンパク質製剤への PEG 化は、PEG が付加されることによる効果は、運動性の向上、水溶性の向上、および排除体積効果である。それらの性質によって、PEG はタンパク質製剤の免疫原性の低減、安定性向上、およびタンパク質製剤の半減期の延長などに寄与し、タンパク質製剤の治療効果の向上に貢献している。また、近年では、PEG 脂質が Covid-19 の mRNA ワクチン脂質ナノ粒子にも用いられている。一見すると、万能な PEG に対して PEG をタンパク質製剤に付加することで、免疫原性が低いとされてきた PEG に対する抗体 (抗 PEG 抗体) 産生が知られるようになった。実際、ウリカーゼやアスパラギナーゼなどの PEG 化製剤において、抗 PEG 抗体 (IgM 抗体や IgG 抗体) 産生が検出されており、これらの抗 PEG 抗体の存在によって治療製剤の安定性が低下され、治療効果を低下させることも報告されている。加えて、これまで PEG 化製剤の治療を受けたことのない健常人においても、抗 PEG 抗体保有者が見いだされていることから、PEG と抗 PEG 抗体に関する関心が高まっている。

2. 研究の目的

本申請者は、PEG 分子に関する免疫原性は PEG の抗原性の性質と免疫原性の異なる性質から成立することを見出している。この見出した抗原性と免疫原性の機能を分離させる特徴に基づき、新たな PEG 分子設計を設計し、新たなタンパク質製剤の PEG 化法を開発することを目的とした。すなわち、従来では到達することが困難と考えられる抗 PEG 抗体、および PEG 受容体に対する結合親和性を PEG によって低下させる新たな手法である。これによって、第一に、PEG 受容体との結合親和性に基づく抗 PEG 抗体産生を抑制する低減する手法となり、第二に、抗 PEG 抗体が存在しても結合親和性が低いために、タンパク質製剤の治療効果を維持することのできる新たな PEG 化手法となる。

3. 研究の方法

本研究において、本申請者は抗 PEG 抗体の産生を低減することのできる新たな PEG 化手法を見出した。タンパク質としての免疫原性の高いウリカーゼ (Uricase *Candida sp. recombinant, expressed in E. coli*) およびアスパラギナーゼ (Asparaginase, from *Escherichia coli*) を用いて、従来の PEG 化とともに新たな PEG 化法を検討した。第一に、ウリカーゼ、アスパラギナーゼの側鎖アミノ基を定量した。従来、および新手法ともに、ウリカーゼ、アスパラギナーゼの側鎖アミノ基の一部に対して PEG 化を行った。新たな PEG 化手法に用いた PEG 修飾スペーサー鎖長と種類の影響とともに検討を行った。得られた各 PEG 化ウリカーゼは紫外可視吸収スペクトル、gel permeation chromatography (GPC)、¹H NMR により導入された PEG を同定し、GPC 測定による吸着特性に基づく安定性評価を行った。また、免疫原性を確認するために *in vivo* 実験を行い、抗 PEG 抗体産生の評価を行った。

4. 研究成果

従来、および新 PEG 化手法はどちらも同程度の PEG 化が導入された。一方、PEG 鎖が同じであるが総分子量が大きい PEG スペーサーを有する新 PEG 化手法は低い PEG 導入量

となったが、GPC 測定の結果、他分子と同等の安定性が得られた。次に、両者の手法によるアスパラギナーゼ、およびウリカーゼの免疫原性を比較したところ、従来法、新 PEG 化手法ともにアスパラギナーゼに対する免疫原性は低く、単回投与、繰り返し投与だけでは顕著な抗 PEG 抗体産生応答が見られなかった。一方、ウリカーゼに対しては従来法では顕著な抗 PEG 抗体産生が確認されたが、新 PEG 化手法においては PEG に対する免疫原性が低減されることが確認された。各スペーサー鎖長を検討したところ、総分子量が大きな PEG 化手法は、PEG 導入量が低い安定性が高く、PEG に対する免疫原性が低いことが明らかとなった。また、ウリカーゼの側鎖アミノ基へ修飾する反応性基質の化学組成によっても、その免疫原性に影響することが明らかとなった。本手法は、従来の PEG 化手法に代わる新たな PEG 化手法として期待できる手法である。

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 0件）

1. 著者名 白石貢一	4. 巻 14
2. 論文標題 分子プローブ開発の視点から見出されるポリエチレングリコール（PEG）における免疫応答	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JSMI Report	6. 最初と最後の頁 10-16
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 有
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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 PEG修飾タンパク質若しくはPEG修飾疎水性物質、又はその製造方法	発明者 白石貢一	権利者 学校法人慈恵大学
産業財産権の種類、番号 特許、P21-0052	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ストーム ヘルト (Storm Gert)	ユトレヒト大学・薬学部・教授	

	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
その他の研究協力者	トゥワン ラマーズ (Twan Lammers)	アーヘン工科大学・工学部・教授	

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			
オランダ	ユトレヒト大学			