

氏名	いさかり ゆう 飯盛 遊		
授与学位	博士(生命科学)		
学位記番号	医博甲第1453号		
学位授与年月日	平成28年3月17日		
学位授与の要件	学位規則第4条1項		
研究科, 専攻の名称	医学系研究科(博士後期課程) 応用分子生命科学系専攻		
学位論文題目	PEG 化タンパク質の反応場および分離場としてのクロマトグラフィープロセスの工学的解析		
論文審査委員	主査	山口大学 教授	山本 修一
		山口大学 教授	堤 宏守
		山口大学 教授	赤田 倫治
		山口大学 准教授	田中 一宏
		山口大学 助教	吉本 則子

【学位論文内容の要旨】

タンパク質に水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を化学修飾した PEG 化タンパク質は高い生体内安定性と低抗原性を有する優れた医薬品である。しかし既存の化学合成法 (液相 PEG 化反応) では PEG 修飾反応の精密な制御は困難である。そのため PEG 化タンパク質医薬品には修飾数および修飾位置の異なる PEG 化タンパク質異性体が含まれている。このため生成物は限外濾過, イオン交換クロマトグラフィー (Ion exchange chromatography, IEC) など複数の単位操作を組み合わせた煩雑な分離工程を経て精製される。さらにタンパク質表層には薬効発現に重要な役割を担っているアミノ酸が存在し, むやみに PEG を修飾すると活性が著しく低下する場合がある。ゆえに特定部位に PEG 鎖が修飾された PEG 化タンパク質を創成する技術が求められている。本研究では IEC 担体上へのタンパク質の固定化より PEG 修飾部位を限定し, 生成物を連続的に分離するプロセスの解明を研究目的とした。

第1章では PEG 化タンパク質のクロマトグラフィー分離に関連した研究についてまとめてある。

第2章では機構モデルに基づき IEC における PEG 化タンパク質の分子認識機構を解析した。PEG 化タンパク質と未修飾タンパク質の溶出塩濃度差は PEG 化タンパク質の PEG 水和層の厚みによく相関された。また多孔性微粒子型 (SPHP) と比較し貫通孔型 (SPMONOLITH) における lysozyme の溶出塩濃度は高い値を示したが吸着サイト数 B 値は同じ値をとった。これは lysozyme と基材 (メタクリレート) の疎水性相互作用のためであると推測される。さらに PEG 化タンパク質も未修飾タンパク質と同様に, 移動相 pH が等電点に近づくと溶出塩濃度および吸着サイト数 B 値はともに低下した。

固相 PEG 化反応における反応収率および修飾数・位置選択性を調べた。多孔性微粒子のイオン交換担体 (SPHP) における固相 PEG 化反応では PEG の分子量が低下するほど収率は向上した。また粒子径が小さいほど収率は向上した。これらの結果より収率は PEG の細孔内拡散効率に影響を受けると考えられる。貫通孔型のイオン交換担体 (SPMONOLITH) における固相 PEG 化反応でも PEG の分子量が低下するほど収率は向上した。しかし PEG 濃度を増加させても収率は3割を超えることはなかった ($M_{w,PEG}5000$)。貫通孔型では多孔性微粒子型よりリジン残基が遮蔽された状態で lysozyme がカラムに吸着していると考えられる。多孔性微粒子型両性イオン交換担体 (Hydroxyl apatite chromatography, HAC) では収率は9割に達した ($M_{w,PEG}5000$)。また HAC では IEC と比較し吸着サイト数がおよそ1低下した。これらの結果より IEC ではカラム吸着に使用されたリジン残基が HAC では

電荷反発により PEG 修飾可能な位置に存在すると考えられる。さらに PEG 修飾位置を pH 勾配クロマトグラフィーにより同定した。液相 PEG 化反応では Lys1, 13, 33, 96, 97, 116 がランダムに修飾された。一方 IEC における固相 PEG 化反応では Lys13, 97, 116 が優先的に修飾され PEG 修飾位置を限定できた。しかし HAC における固相 PEG 化反応では液相 PEG 化反応と同様にランダムに PEG 化が進行した。多孔性微粒子型担体における固相 PEG 化反応では自由拡散領域である細孔内での拡散効率が低下するに従い反応までに活性化 PEG が加水分解される割合が増すため収率が低下すると考えられる。また IEC と比較し HAC では吸着サイト数 B 値が 1 低下したことは IEC ではカラムに吸着され修飾されなかった Lys33 が HAC では PEG 修飾されたことと対応すると予想される。さらに B 値の低下 (タンパク質のカラムへの吸着面積の低下) に伴い収率は増加する一方で選択性が低下した。一方貫通孔型 IEC カラムでは位置が限定できるものの収率は低い値を示した。

第 3 章では生成物の分離プロセスを構築するため試料 (モデルタンパク質, PEG およびモデル PEG 化タンパク質) の物質移動特性を解析した。最適化されたマイクロ化 Taylor 法により分子拡散係数, D_m を測定した。また *van Deemter* 式により試料の細孔内拡散係数, D_s を算出した。また物質移動特性および分配係数 K を用いて機構モデルに従い PEG 化タンパク質とタンパク質の分離度の流速依存性を算出した。PEG 化タンパク質のような分子半径の大きな分子を多孔性微粒子型クロマトグラフィーにて分離する際には、流速を増加させると分離度が著しく低下することが明示された。

第 4 章では、プラスミド・ワクチンなどの巨大分子の分離に適している貫通孔型モノリスクロマトグラフィーを用いて PEG 化タンパク質反応液の分離条件を最適化した。具体的には移動相の pH, 塩濃度直線勾配, 圧力損失などを考慮し複数の異性体を迅速に精密分離する手法を開発した。本手法は 1 測定あたり 6 分以内で実施可能であり, PEG 化反応プロセスの解析に適応できる。

第 5 章では上述の結果を総括した。

【論文審査結果の要旨】

タンパク質に水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を化学修飾した PEG 化タンパク質は高い生体内安定性と低抗原性を有する優れた医薬品である。しかし既存の液相反応では PEG 修飾反応を精密に制御できないので反応生成物には修飾数および修飾位置の異なる PEG 化タンパク質異性体が含まれている。このため目的の PEG 化タンパク質は膜やクロマトグラフィーを組み合わせた煩雑な分離工程を経て精製される。さらにタンパク質表層には薬効発現に重要な役割を担っているアミノ酸が存在するので、むやみに PEG を修飾すると活性が著しく低下する場合があります。特定部位に PEG 鎖を修飾する技術が求められている。本研究ではイオン交換クロマトグラフィー (ion exchange chromatography, IEC) 担体上へのタンパク質の固定化により PEG 修飾部位を限定し、生成物を効率的に分離するプロセスの解明を研究目的としている。

第 1 章では PEG 化タンパク質のクロマトグラフィー分離に関連した研究をレビューしている。

第 2 章では機構モデルに基づき IEC における PEG 化タンパク質の分子認識機構を解析した。PEG 化タンパク質と未修飾タンパク質の溶出塩濃度差は PEG 化タンパク質の PEG 層の厚みによく相関された。また多孔性微粒子型担体と比較し貫通孔型担体における lysozyme の溶出塩濃度は高い値を示したが吸着サイト数は同じ値をとった。これは lysozyme と基材の疎水性相互作用のためであると推測される。次に固相 PEG 化反応における反応収率および修飾数・位置選択性を調べた。多孔性微粒子担体による固相 PEG 化反応では PEG の分子量が低下するほど、また粒子径が小さいほど収率は向上し、収率は PEG の細孔内拡散に影響を受けると考えられる。貫通孔型担体における固相 PEG 化反応でも PEG の分子量が低下するほど収率は向上した。多孔性微粒子型両性イオン交換担体 (Hydroxyl apatite chromatography, HAC) では収率は 9 割に達した。また HAC では IEC

と比較し吸着サイト数がおおよそ1低下した。これらの結果より IEC ではカラム吸着に使用されたリジン残基が HAC では電荷反発により PEG 修飾可能な位置に存在すると考えられる。PEG 修飾位置を pH 勾配クロマトグラフィーにより同定した。液相 PEG 化反応では6個のリジン残基がランダムに修飾されたが、固相 PEG 化反応では3か所が優先的に修飾され PEG 修飾位置を限定できた。しかし HAC における固相 PEG 化反応では液相 PEG 化反応と同様にランダムに PEG 化が進行した。多孔性微粒子型担体における固相 PEG 化反応では細孔内での拡散効率が低下するに従い反応までに活性化 PEG が加水分解される割合が増すため収率が低下すると考えられる。また IEC と比較し HAC では吸着サイト数が1低下したことは IEC では修飾されなかった箇所が HAC では PEG 修飾されたことと対応する。吸着サイト数の低下 (タンパク質の担体吸着面積の低下) に伴い収率は増加する一方で選択性が低下した。貫通孔型では位置が限定できるものの収率は低い値を示した。

第3章では生成物の分離プロセスの効率化のため物質移動特性を解析した。Taylor 法により分子拡散係数を非吸着条件の溶出曲線から細孔内拡散係数を算出した。拡散物質移動と分配係数を考慮したモデルで解析したところ PEG 化タンパク質の多孔性微粒子型 IEC において流速の増加により分離性能が著しく低下することが示された。

第4章では、巨大バイオ分子の分離に適している貫通孔型 IEC による PEG 化タンパク質反応液分離条件を最適化した。移動相 pH, 塩濃度直線勾配, 圧力損失などを考慮し複数の異性体を迅速(6分以内)に精密分離する手法を開発し PEG 化反応プロセスのモニタリングができることを示した。

第5章では上述の結果を総括した。

公聴会には、本学の教員・学生、および製薬会社の研究者が参加し、多くの質問がなされた。質問は、主として以下の3つの観点に分類された。

- [1] PEG 化タンパク質を使用するためには修飾部位を厳密に制御する必要があるのか。
- [2] アパタイトで反応収率が高いことは担体の構造と関係があるのか。また、固相担体上での吸着構造により収率を向上できるのか。
- [3] バルク液相中の PEG と固体界面に存在する PEG の構造は一緒なのか。収率が下がることと構造の違いが関係しているのではないのか。

どの質問に対しても発表者からの確かつ明確に回答がなされた。

以上より、本研究は独創性、新規性に優れ、博士(学術)論文に十分値するものと判定した。論文内容および審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。

関連論文 計4編 (査読付き国際会議のプロシーディング2編含む)

- (1) 著者氏名: Noriko Yoshimoto, Yu Isakari, Daisuke Itoh, Shuichi Yamamoto

論文題目: PEG chain length impacts yield of solid-phase protein PEGylation and efficiency of PEGylated protein separation by ion-exchange chromatography: Insights of mechanistic models

学術雑誌名: Biotechnology Journal

巻、号、頁: Vol.8, No.7, pp801-810

発行年月: 2013年7月発行

- (2) 著者氏名: Yu Isakari, Ales Podgornik, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto,

論文題目: Monolith disk chromatography separates PEGylated protein positional isoforms within minutes at low pressure

学術雑誌名: Biotechnology Journal

巻、号、頁: Vol.11, No.1, pp100-106

発行年月: 2015年12月発行

- (3) 著者氏名 : Yu Isakari, Masataka Hamachi, Daisuke Itoh, Noriko Yoshimoto and Shuichi Yamamoto
論文題目: Solid Phase Technology - PEGylation and Refolding of Proteins on Column Chromatography -
学術雑誌名 : Proceedings of 9thICSST
卷、号、頁 : No. GP-18, pp.1-4
発行年月 : 2011 年 11 月発行
- (4) 著者氏名 : Yu Isakari, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto
論文題目: Analysis of chromatographic separation for PEGylated proteins on the basis of their diffusion behaviors in porous particles
学術雑誌名 : Proceedings of MMPE2
卷、号、頁 : No. P-45, pp.351-356
発行年月 : 2014 年 9 月発行