

Fig.13 Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled nano-silica intravenously. After 3, 6 hours, Serum IL-6 (A) and TNF- α concentration (B) of mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4).

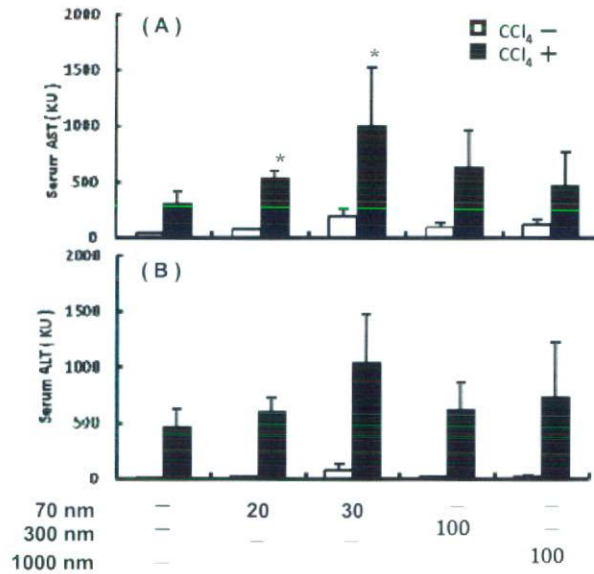


Fig.14 Acute liver injury in mice treated with CCl₄ and labeled nano-silica. Mice were injected CCl₄ intraperitoneally and labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, serum AST(A) and ALT (B) level of mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4). : * $p < 0.05$ vs. only CCl₄

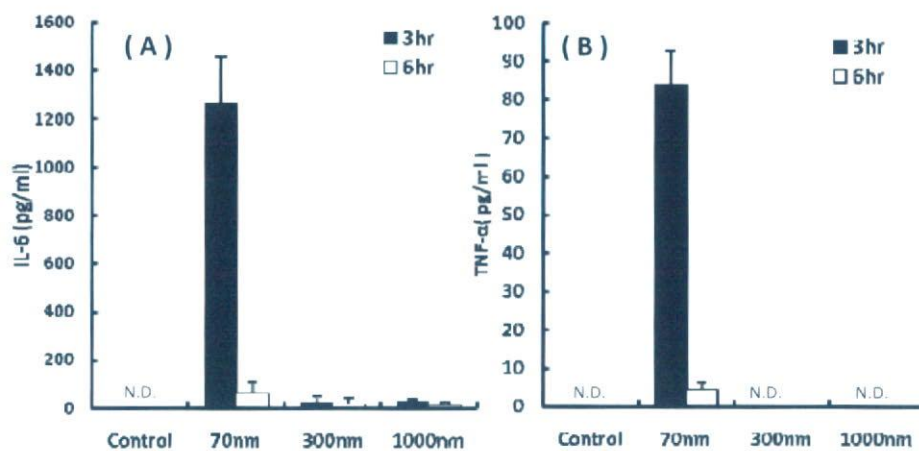


Fig.13 Acute liver injury in mice treated with labeled nano-silica. Mice were injected labeled nano-silica intravenously. After 3, 6 hours, Serum IL-6 (A) and TNF- α concentration (B) of mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4).

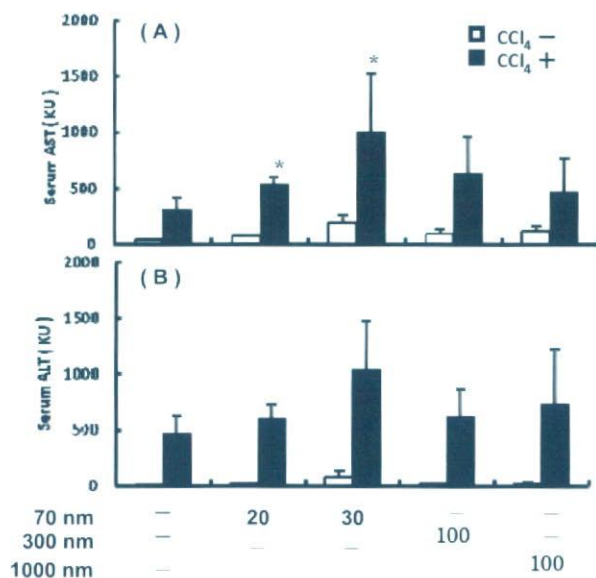


Fig.14 Acute liver injury in mice treated with CCl₄ and labeled nano-silica. Mice were injected CCl₄ intraperitoneally and labeled nano-silica intravenously. After 24 hours, serum AST(A) and ALT (B) level of mice was measured. Each point represents the mean \pm S.D.(n=4). : * $p < 0.05$ vs. only CCl₄

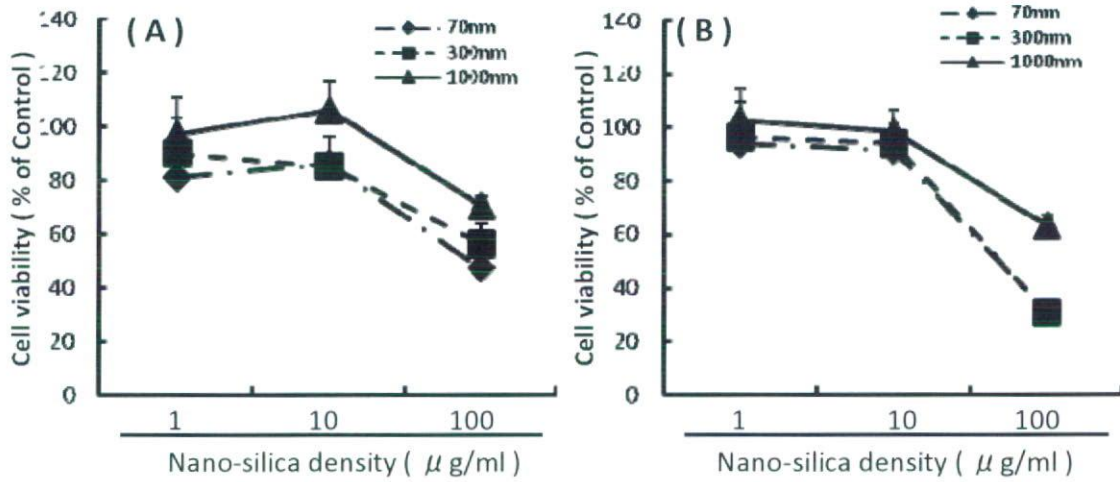


Fig.17 Cell injury in mouse hepatocytes treated with labeled nano-silica. Murine hepatocytes were exposed to labeled nano-silica. After 24 (A) and 48 (B) hours , cell viability was measured.

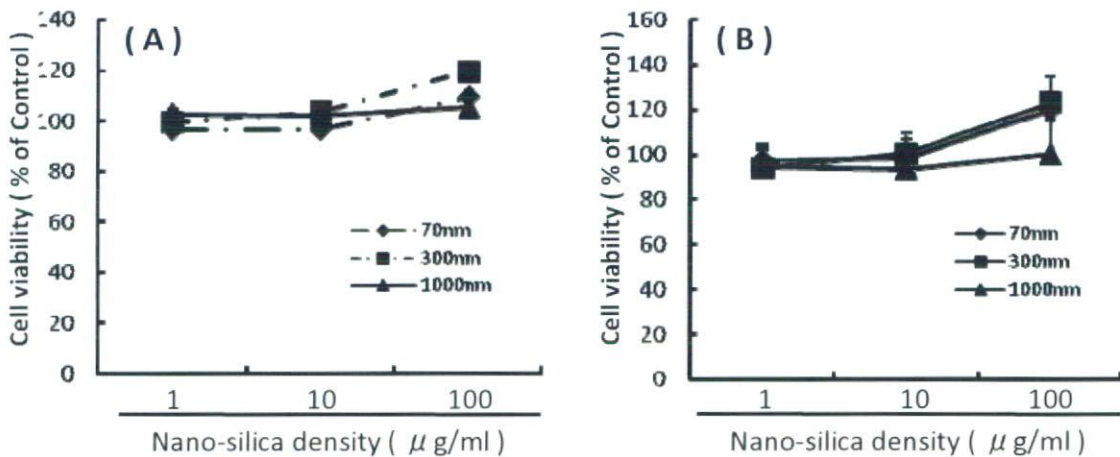


Fig.18 Cell injury in Caco2 cells treated with labeled nano-silica. Caco2 cells were exposed to labeled nano-silica. After 24 (A) and 72 (B) hours , cell viability was measured.

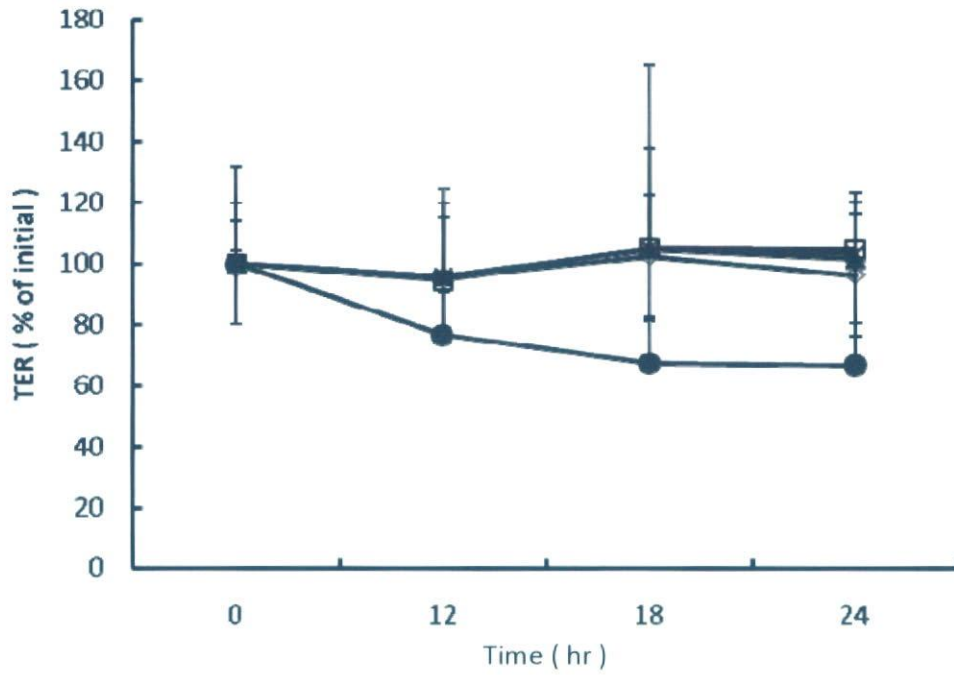


Fig.19 Effect of labeled nano-silica on TER of Caco-2 Cells. Caco2 cells monolayers were treated with labeled nano-silica for 24h. Each point represents the mean \pm S.D.(n=3). Control ; \diamond , 70nm nano-silica ; \square , 300nm nano-silica, 300nm nano-silica ; \blacktriangle , 1000nm nano-silica ; \times , C-CPE 20 μ g/ml ; \bullet . TER, transcellular electrical resistance.

平成19年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

〈ファージ表面提示法を用いたトキシコプロテオミクス解析法の確立〉

分担研究者 鎌田 春彦 (独)医薬基盤研究所創薬プロテオミクスプロジェクト 主任研究員

昨今のナノテクノロジーの著しい進歩に伴い、医薬品・化粧品・食品領域でのナノマテリアルの実用化が目覚ましい勢いで進展しており、我が国は『ナノマテリアルの有効活用・上市』の観点で世界をリードしている。一方で、フラーレンの脳神経毒性やナノカーボンの肺障害等が相次いで報告されたことも相俟って、ナノマテリアルの安全性が地球規模で懸念されはじめている。しかし残念ながら、ナノマテリアルの安全性研究は、欧米等で『ナノマテリアルの社会受容の促進』の観点から国家レベルで推進されつつあるものの、我が国では殆ど進展していないのが現状である。そのため、ナノマテリアルのヒト健康への影響(リスク)を評価できる実験系の開発や、そのための毒性マーカーの同定、これに基づいた安全なナノマテリアルの利用に関する指針の確立等が急務となっており、特にトキシコプロテオミクスへの期待が高まっている。本観点から、分担研究者は、当該研究領域で最先端の研究を進めているダリオ・ネリ教授のもとへ出向し、トキシコプロテオミクスによるナノマテリアルの安全性評価システムの開発に資する研究を行い、以下に示す有益な基盤技術を獲得した。即ち、細胞内タンパク質のコンタミネーションを招いてしまうことなく、膜タンパク質や細胞外マトリクスを効率よく回収し、これらのプロテオーム解析を選択的に実施できるサンプル調整法、『*in vivo biotinylation method*』を修得した。当該基盤技術を適用することで、ナノマテリアルによって影響を受けた『膜タンパク質や細胞外マトリクス』の発現変動を効率よくプロテオーム解析し、リスクマーカー同定できようになるため、今後のナノトックス(ナノマテリアルの毒性)のスクリーニングシステムの構築に有用と考えられる。また、本方法により、同定された抗原に対する抗体を、ファージ抗体ライブラリを用いて、迅速作製することで、ナノマテリアルのリスクマーカーを、より容易に高感度かつ高効率で検出できるものと考えられる。次年度以降は、本技術のさらなる改良と共に、帰国後、ナノトックス解析への展開を図る予定である。

A.研究目的

ナノマテリアルの安全性評価において、細胞内外および細胞膜に発現するタンパク質の発現挙動を時空間的、質的、量的に評価し、リスク発現との関連を精査することは、極めて重要となる。しかしながら、細胞外・細胞膜上のタンパク質は、細胞内タンパク質よりも相対的に量が少ないため、効率の良いプロテオーム解析は困難となっている。そこで『プロテオミクスを有効活用したナノトックス解析基盤』を世界に先駆けて開発し、ナノリスクマーカーの同定およびナノトックス評価系の開発を目的に、まずダリオ・ネリ教授に協力頂き、*in vivo*における膜タンパク質、および細

胞外マトリクスの発現挙動の違いを検出し得るプロテオミクス技術の修得、特にサンプル調整に最適化を図った。

B.研究方法

膜タンパク質および細胞外マトリクス等を標的としたトキシコプロテオミクス技術の修得に際し、①細胞レベルでのナノトックス解析ではなく、ナノマテリアルの個体レベルでの健康影響(安全性/毒性)を評価・解析すること、②リスクマーカーの同定を行うため、プロテオミクス解析に基づいたプロテインデータベースが高度に充実していることを必須条件とした結果、マウスをモデル動物と

して利用することとした。細胞膜タンパク質、および細胞外マトリクスの発現挙動の解析には、ダリオ・ネリ教授が先駆けて独自開発した、*in vivo biotinylation method* を活用し、細胞膜および細胞外マトリクスの発現挙動の変化をプロテオーム解析した。Scheme 1 にその概要をフローチャートにして示す。本方法で用いるビオチン化試薬を、*in vivo* に直接投与し、組織をラベル化した例は他に殆ど例が無く、斬新なアプローチである。また、還流後のビオチン化ラベル組織を用いて、タンパク質を精製し、プロテオーム解析した例は、当研究室において世界に例がなく、極めて独創的な方法といえる。少なくとも、我が国においては、このように個体レベルでのプロテオーム解析に着目した研究さえない。なお本年度は、技術確立・修得を目的としたため、ナノマテリアルを作用させていないコントロールについて *in vivo biotinylation method* の検討を行い、プロテオーム解析に値するサンプル調整を試みた。

また本 *in vivo biotinylation method* は、細胞膜タンパク質を解析する場合に、現在汎用されている組織抽出後の膜タンパク質を回収する方法とは異なり、直接組織細胞の外側からラベル化を行うため、小胞膜のコンタミネーションのリスクを回避できる。当然のことながら、細胞外の膜タンパク質等を選択的にビオチンラベルするため、解析結果から得られたタンパク質候補に対するモノクローナル抗体は、通常の方法でプロテオーム解析して得られたタンパク質候補(多くの場合、シャペロンタンパク質やヒートショックプロテインといった細胞内タンパク質)に対する抗体よりも、基礎医学・臨床医学的な有用性に優れていることは言うまでもない。そのうえ、血管側からビオチン化しているため、組織中の血管内皮細胞がより効率よくラベル化されている可能性も考えられ、今後の詳細な検討に興味を持

たれるところである。

そこで、Figure 1 に示した装置を設置し、マウスをビオチン化試薬により還流した。還流後、Tris 溶液にて、未反応のビオチン化試薬をクエンチングし、ビオチン化された組織を回収した。回収した組織を、手早く液体窒素にて凍結し、 -80°C にて保存した。また同時に、組織染色用にマウント剤に組織を入れ、凍結切片作製用組織を -80°C にて保存した。その後、Scheme 1 に従って、プロテオーム用のサンプルを作製した。

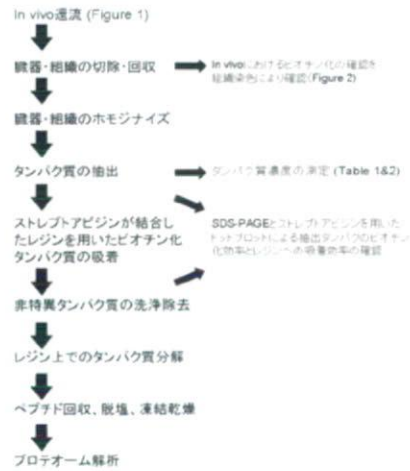
C. 研究結果

肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節、子宮、筋肉、胸腺など、ビオチン化された“主要な組織”を回収した。次に *in vivo* におけるビオチンラベル化の効率を評価するため、マウスから回収した組織の凍結切片を作製した(Figure 2)。赤で染色された部分がビオチン化された組織、青で染色された部分は、ヘマトキシリン染色された部分である。その結果、全ての組織でビオチンラベルが成功していること、一方で同一組織内でもラベル化効率に差が生じてしまうことが明らかとなった。このラベル化効率の相違は、病体組織(肝臓)を実験に供したため、その一部で正常な血管構造が破綻し、血液還流効率が局所的に低下した可能性が考えられた。今後、ドットプロット等の方法により、組織におけるタンパク質のビオチン化効率を詳細に検討する予定である。続いて、上記臓器からのタンパク質の抽出を行った結果を Table 1 および Table 2 に示した。現在、この抽出タンパク質を用いて、Scheme 1 に示した方法に従って、順次、プロテオーム解析を実施しているところである。

D. 今後の予定

来年度初期は引き続き、プロテオミクスによる

ナノトックス解析基盤の確立に向けた技術修得・開発・最適化を、ダリオ・ネリ教授と共に行う予定である。先述したように *in vivo biotinylation method* は、個体レベルでのトキシコプロテオミクスを可能とするうえ、細胞膜タンパク質および細胞外マトリクスを効果的にラベル化できる方法であり、細胞質内タンパク質のコンタミネーションを回避できるという圧倒的な利点を有している。現在、基盤研創薬プロテオミクスプロジェクトにおいて、優れたファージ抗体ライブラリが既に作製済みであることから、今後、本方法を用いて同定された抗原に対する抗体を作製することで、ナノマテリアルのリスクマーカーの検出や評価に利用できるものと期待される。来年度帰国後には、ビオチン化試薬のラベル化方法を工夫（例えば、ラベル化試薬を、直接皮膚に塗布、経肺的に吸引、あるいは粘膜部位に塗布するなど）することによって、ナノマテリアル暴露後の動物モデルの組織における組織内のタンパク質発現状態の違いを直接解析可能になることから、*in vivo* におけるナノマテリアルのトキシコプロテオーム解析に貢献できると確信している。医薬基盤研究所にて現在推進しているナノマテリアルの毒性評価に、*in vivo biotinylation method* を有効活用し、我が国独自のナノマテリアルの社会受容の促進研究を進めるため、Table 3 に示したタイムスケジュールで、ナノマテリアルの持つ生物学的特性（細胞傷害性、免疫活性化能等）を順次解析する予定である。



Scheme 1. *in vivo* 遠流法を用いた臓器タンパク質のプロテオーム解析

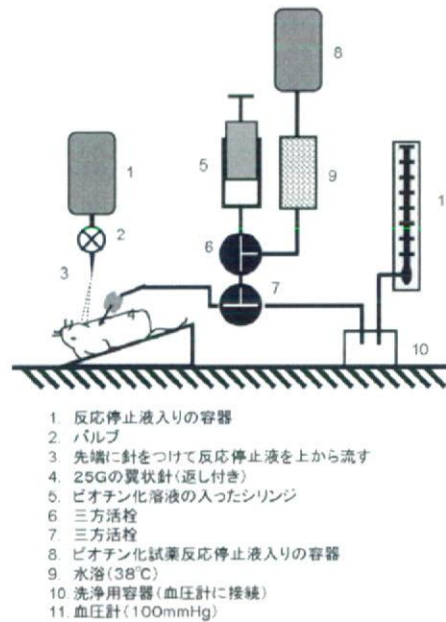


Figure 1 遠流装置の設置図

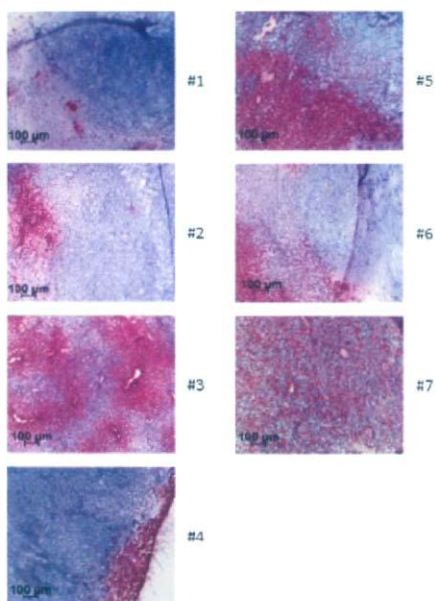


Figure 2. 組織染色によるビオチン化の確認

	Liver	annotation	staining ratio	(note)	LN	annotation	spleen	annotation
Biotinylated sample	#1	Big liver mets	20% - 30%	only staining a part of tissue	A4B	between liver and stomach	A4C	with 2-3 mets
	#2	with little normal liver mets	20% - 30%	only staining a part of tissue	A5B	mesenterium	A5D	with 2 mets
	#3	Large single liver mets	60% - 70%	good staining	A8D	between spleen and stomach	A8E	with 2-3 visible mets
	#4	with multiple mets	5% - 10%	only round part of tissue	A14H	mesenterium	A8E	3-5 mets
	#5	with multiple mets	50% - 60%	good staining	A16G	mesenterium	A14D	huge meth (1)
	#6	with multiple mets	10% - 20%	only round part of tissue	A17B	mesenterium	A16D	with 4-5 mets
	#7	with multiple mets	70% - 80%	good staining	A1C	mesenterium	A17D	with 2 little mets
non-biotinylated samp	#1	with mets (many)	(negative)	(negative)	NA1E	mesenterium	NA1C	3 visible mets

Table 1 疾患モデル動物組織より回収したタンパク量

Disease mice	protein conc. (μg/ml)	Liver	Lymph nodes	spleen
Biotinylating agent perfusion mice	#1	3045	2425	2603
	#2	3046	2467	2389
	#3	2707	2693	2717
	#4	2512	2106	2512
	#5	2804	2806	2468
	#6	3131	2613	2548
	#7	2927	2662	2577
Buffer perfusion mice	#1	2863	2604	2742

Table 2. 正常動物組織より回収したタンパク量

Normal mice	protein conc. (μg/ml)	Liver	Lymph nodes	spleen	kidney	ovary	thymus	muscle
Biotinylating agent perfusion mice	#1	3314	2760	2338	3323	1777	3225	3216
	#2	3650	2329	2693	2396	1560	2681	3256
	#3	3730	2412	2419	2382	1997	2408	3366
	#4	3588	NE	2649	3126	1780	2520	2649
	#5	4008	NE	2676	3112	2244	2689	3271
Buffer perfusion mice	#1	3416	3744	3447	3315	3515	3002	3515

NE: not excision

Table 3 タイムスケジュール(予定)

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
プロテオーム解析(海外出張先)												
サンプル調整		→										
2D-LCによるスポットティング			→	→								
Msによるタンパク質の同定				→	→							
ペプチド・マッピングによる発現の差異確認					→	→						
データの解析・まとめ						→	→					
トキシコプロテオーム解析												
トキシコプロテオームのモデル選定							→	→	→	→	→	→
Msの検定							→	→	→	→	→	→
2D-LCの設定							→	→	→	→	→	→
モデルタンパク質の解析							→	→	→	→	→	→
ピオチンラベル化							→	→	→	→	→	→
サンプル調整							→	→	→	→	→	→

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
堤 康央、 石井明子、 早川堯夫	第6節 機能性人工たんぱく質	早川堯夫	バイオ医薬品の品質・安全性評価	株エル・アイ・シー	東京都	2007	p.369-378
向 洋平、 堤 康央、 中川晋作	絵で見てわかるナノDDS 細胞内薬物導入キャリアとしての細胞内移行ペプチドの応用技術	田畑泰彦	遺伝子医学MOOK 別冊	株メディカルドゥ	大阪市	2007	p.184-190

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S.	Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain.	Biol. Pharm. Bull.	30(2)	218-223	2007
Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding capacity of tumor necrosis factor mutants.	BBA - Proteins and Proteomics.	1774(8)	1029-1035	2007

Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S.	Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library.	Pharmazie	62(8)	569-573	2007
Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	363	1027-1032	2007
Shibata H., Kamada H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Taniai M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB. Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Creation and X-ray Structure Analysis of the Tumor Necrosis Factor Receptor-1-selective Mutant of a Tumor Necrosis Factor- α Antagonist	J.Biol. Chem.	283	998-1007	2008

Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Comparative study on transduction and toxicity of protein transduction domains	Br. J. Pharmacol		1-10	2008
Kamada H., Shibata H., Tsutsumi Y.	Development of new anti-TNF therapy.	Inflammatio n and Regeneration	27	512-515	2007
Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity	Immunol. Methos.		in press.	
Katsuhiko Isoda, Noritaka Kagaya, Soichiro Akamatsu, Shinji Hayashi, Makoto Tmesada, Aiko Watanabe, Masakazu Kobayashi, Yoh-ichi Tagawa, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi.	Hepatoprotective Effect of Vitamin B12 on Dimethylnitr osamine-Induced Liver Injury	Biol. Pharm. Bull.	31	309-311	2008

Kiyohito Yagi, Midori Kojima, Suguru Oyagi, Etsuko Ikeda, Motihiro Hirose, Katsuhiko Isoda, Masaya Kawase, Masuo Kondoh, Hajime Ohgushi.	Application of mesenchymal stem cells to liver regenerative medicine	Ykakugaku Zasshi.	128	3-9	2008
Shinji Hayashi, Ayano Itoh, Katsuhiko Isoda, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi.	Fucoidan partly prevents CCl4-induced liver fibrosis	Eur. J. Pharmacol.	580	380-384	2008

第6節 機能性人工タンパク質

1. はじめに

本章で前述されている抗体をはじめ、ホルモン、酵素、血液凝固因子、ワクチン、さらにはインターフェロン類、顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポエチンなどのサイトカイン類やそのレセプターを含む機能性タンパク質は、遺伝性疾患、代謝異常、循環器病、がん、免疫疾患、感染症などの各種疾病に対する従来にはない特異的な薬効を発揮する医薬品として医療に大きなインパクトを与えてきた。最近、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス等の進展も相俟って、各種疾病の治癒に資すると思われるタンパク質(医薬品シーズ・タンパク質)を探索・同定し、これら医薬品シーズ・タンパク質を安全かつ効果的に疾病治療できる医薬品として開発しようとする試みが益々注目を集めるようになってきた。しかし、「医薬品シーズ・タンパク質」そのものを医薬品として使用しようとしても、これらは一般に体内安定性に極めて乏しいことや投与方法に限界があるために、臨床応用の際には全身に大量頻回投与を余儀なくされ、コンプライアンス面はもとより安全性・有効性面で必ずしも満足すべき結果が得られないことが往々にしてある。ちなみにサイトカインなどの生体内生理活性タンパク質は、様々な細胞上の複数のレセプターを介したり、活性タンパク質間のクロストークやフィードバック機構などを通じて、“必要な場所で、必要なタイミングと濃度で”多彩な *in vivo* 生理活性を示すものである。こうした生理活性タンパク質の薬理的効果を期待して生理的濃度を超えて非経口的

(全身)に投与すると、これらが非生理的な時空間で、非生理的な濃度でレセプターや他の生体機能分子と相互作用することになり、目的とする治療作用のみならず副作用の原因となる他の作用までも同時に発現してしまうことも少なからずある。これらの理由から、多くの機能性タンパク質のうちでそれ自体が医薬品化されたタンパク質は一部にすぎない。そこで、上記課題を克服し、医薬品シーズ・タンパク質の有効性と安全性を確保することを可能とする創薬技術の開発は、疾患関連タンパク質として探索・同定されたものをより多く医薬品化するためのキーポイントと言える。以上の観点から現在、機能性タンパク質の医薬品化を目指して生物学的あるいは化学的アプローチを用いて、有効性と安全性に優れた“機能性人工タンパク質”を創出しようとする試みがなされており、コンセンサスイターフェロンのようなタンパク質のアミノ酸配列改変体はもとより、ペグイントロンやペガシスのようなポリエチレングリコール(PEG)修飾タンパク質などが実際に臨床へ供され始めている。本節では、すでに医薬品として開発された機能性人工タンパク質について概説すると共に、新たな機能性タンパク質の創出技術並びに機能性人工タンパク質の品質、安全性確保策について述べることにする。なお近年、医薬品として多くの品目が承認されているヒト化モノクローナル抗体やその修飾体も機能性人工タンパク質の範疇ではあるが、すでに本章第4節および第5節で取り上げられているので本稿では言及しない。

2. 上市されている機能性人工タンパク質

これまでに日米EUで承認されたタンパク質性医薬品の中で、“機能性人工タンパク質”と位置づけられる主なものを表1に示した。アミノ酸配列改変型、糖鎖改変型、PEG結合型、融合タンパク質に分類される。主として投与回数・投与量の削減を目指し、薬効の持続性を得るため体内(血中)での安定性の向上を図る、特定レセプターへの指向性付与(ターゲティング能の導入)を図る、また薬物自体の有効成分放出システムや作用機構を制御する設計を施して持続性や速効性を図るといった“タンパク質の体内動態制御”を目的とした改変が施されている場合が多い。言い換えれば、前項で述べたタンパク質の生体内における時空間的挙動を制御しようとするドラッグ・デリバリー・システム(Drug Delivery System: DDS)の1つとして、機能性人工タンパク質の創製が試みられているものが中心と言えよう。以下に、それぞれの機能性人工タンパク質の特性について簡単に述べる。医薬品の名称は、日本名が決められているものについてのみ日本語を併記した。

2.1 アミノ酸改変型

(1) 改変型インスリン

・ Insulin lispro

インスリン リスプロ(ヒューマログ®)

インスリン B 鎖 28 番目の Pro を Lys に、B 鎖 29 番目の Lys を Pro に置換した改変体。インスリン分子間での会合を抑制する結果、多量体形成が阻害され、投与部位から血中への速やかな移行を実現した速効型インスリンである。

・ Insulin Aspart インスリン アスパルト

(ノボラビッド®)

インスリン B 鎖 28 番目の Pro を Asp に置換し

た改変体。分子間の疎水的相互作用を抑制し、多量体形成が抑制される結果、投与部位から速やかに血中へ移行するため、速効型インスリンと位置づけられる。

・ Insulin Glulisine (Apidra®)

インスリン B 鎖 3 番目の Asn を Lys に、B 鎖 29 番目の Lys を Glu に置換した改変体。多量体形成が抑制されるため、血中への速やかな移行が可能となった速効型インスリン。

・ Insulin Glargin

インスリン グラルギン(ランタス®)

インスリン B 鎖 C 末端に Arg を 2 個付加し、A 鎖 C 末端の Asn を Gly に置換した改変体。等電点がインスリンの pH 5.4 より中性側にシフトしているため、pH 4.0 の製剤中では完全に溶解しているが、皮下投与されると pH が 7.0 まで上昇するために投与部位で微細な不溶体を形成する。個々のインスリン分子は、その不溶体からゆっくりと再溶解されて循環血中に入るため、血中にインスリンが徐放され、薬効の持続化が図られる。

・ Insulin Detemir インスリン デテミル(Levemir®)

インスリン B 鎖 30 番目の Thr を欠損させ、B 鎖 29 番目(C末端)Lys の ε アミノ基に C14 脂肪酸を結合した改変体。アルブミンへの結合性を持つため、血中での滞留性が向上している。また投与部位での多量体形成とアルブミン結合性のため、血中に徐放されることから、薬効の持続化が期待される。比活性はインスリンと比較して低く、脂肪細胞における脂質合成を指標にした *in vitro* の代謝促進作用はインスリンの約 27% であり、インスリン受容体に対する親和性はインスリンの約 46% であること、また、インスリン様成長因子 IGF-1 受容体を介した細胞増殖促進作用はインスリンの約 11%、IGF-1 受容体に対する親和性はインスリンの約 16% であると報告されている¹⁾。

表1 日米EUで医薬品として承認されている機能性人工タンパク質

分類	一般名	適応疾患	改変部位	付加された主な機能
アミノ酸配列改変型				
インスリン	Insulin Lispro	糖尿病	B28Pro→Lys, B29Lys→Pro	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	Insulin Aspart	糖尿病	B28Pro→Asp	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	insulin Glulisine	糖尿病	B3Asn→Lys, B29Lys→Glu	速効性(多量体形成抑制, 血中移行促進)
インスリン	Insulin Glargin	糖尿病	A鎖のC末端のAsn→Gly, B鎖のC末端にArg2個付加	持続性(中性pHでの溶解性低下による徐放化)
インスリン	insulin Detemir	糖尿病	B30Thr欠損, B29LysにC14脂肪酸結合	持続性(アルブミンとの結合による)
t PA	Retepase	急性心筋梗塞	Fドメイン, EGFドメイン, K1ドメイン欠損, 糖鎖なし	血中半減期延長
t PA	Tenecteplase	急性心筋梗塞	K1ドメインの2アミノ酸置換, Pドメインの4アミノ酸置換	血中半減期延長
t PA	Pamiteplase	急性心筋梗塞	K1ドメイン欠損, Arg275→Glu	血中半減期延長
インターフェロンα	Interferon alfacon-1	C型肝炎	各サブタイプで出現頻度の高いアミノ酸に置換	比活性上昇
G-CSF	Nartograstim	好中球減少症	N末端付近5アミノ酸置換	比活性上昇
糖鎖改変型				
グルコセレブロンダーゼ	Imiglucerase	ゴーシェ病	シアル酸を酵素的に除去し, 糖鎖末端をマンノースに	標的細胞(マクロファージ)への取り込み促進
エリスロポエチン	Darbepoetin alfa	貧血	アミノ酸置換によりN型糖鎖付加部位を2カ所追加	血中半減期延長
PEG結合型				
インターフェロンα	Peginterferon alfa 2a	C型肝炎	PEG修飾(40 kDaの分岐型PEG, 1カ所, Lys)	血中半減期延長
インターフェロンα	Peginterferon alfa-2b	C型肝炎	PEG修飾(12 kDaのPEG, PEG, 1カ所, Lys他)	血中半減期延長
G-CSF	Pegfilgrastim	好中球減少症	PEG修飾(20 kDaのPEG, 1カ所, N末端)	血中半減期延長
成長ホルモン誘導体	Pegvisomant	先端巨大症	9アミノ酸置換+PEG修飾(5kDaのPEG, 4-6カ所, Lys)	GHアンタゴニストとしての作用+血中半減期延長
融合タンパク質				
サイトカイン+毒素	Denileukin Diftitox	皮膚T細胞リンパ腫	Diphtheria toxin+IL2	IL2受容体に結合
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Etanercept	関節リウマチ	TNFR+Fc	TNFに結合+血中濃度持続
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Alefacept	尋常性乾癬	1FA3+Fc	CD2に結合+血中濃度持続
膜タンパク質細胞外ドメイン+Fc	Abatacept	関節リウマチ	CTLA4+Fc	CD80/CD86に結合+血中濃度持続

(2) 改変型 tissue-plasminogen activator (t-PA)

・ Reteplase (Retavase[®])

t-PA のドメインのうち、K2 ドメイン (Kringle2 ドメイン) と P ドメイン (プロテアーゼドメイン) の2つのドメインのみからなる改変体。非改変型の t-PA では血中半減期が約 3 分であるため、点滴静注 (持続投与) によりようやく薬効が得られるが、Reteplase の血中半減期は 90 分以上と延長されており、単回の静脈内投与が可能となっている。また、フィブリン親和性減少のため、血栓への浸透性が高く、血栓の速やかな溶解が可能であるとされている。

・ Tenecteplase (TNKase[®])

t-PA の K1 ドメインの 103 番目の Thr を Asn に、117 番目の Asn を Glu に置換し、P ドメインの 4 つの Ala を置換した改変体。非改変型と比較して、フィブリン親和性および、t-PA の阻害因子である plasminogen activator inhibitor-1 への抵抗性が上昇し、血中半減期が延長されている。

・ Pamiteplase パミテブラーゼ (ソリナーゼ[®])

t-PA の K1 ドメインを欠損させ、天然型 t-PA で N 末端から 275 番目の Arg を Glu に置換した改変体。フィブリンに対する高い親和性を有し、プラスミノゲン活性化作用がフィブリンにより顕著に増強され、血中半減期も延長されている。

(3) 改変型インターフェロン

・ Interferon alfacon-1

インターフェロン アルファコン-1 (アドパフェロン[®])

ヒトインターフェロンアルファの 12 種類のサブタイプのアミノ酸配列において、各位置のアミノ酸を出現頻度の最も高いアミノ酸に置換した改変体。コンセンサスインターフェロンとも呼ばれる。現在臨床に供されている「PEG 非修飾型」のインターフェロンアルファ (主としてインターフェロン $\alpha 2a / \alpha 2b$) と比較して、高い抗ウイルス活性、抗肝炎活性を示す。

(4) 改変型顆粒球コロニー刺激因子

・ Nartograstim ナルトグラスチム (ノイアップ[®])

Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) の N 末端側から 1, 3, 4, 5, 17 番目のアミノ酸が Ala, Thr, Tyr, Arg, Ser に置換した改変体。天然型の G-CSF と比較して、約 3 倍の比活性を示す。

2.2 糖鎖改変型

(1) 糖鎖改変型グルコセレブロシダーゼ

・ Imiglucerase イミグルセラール (セレザイム[®])

CHO 細胞で生産された β -グルコセレブロシダーゼをシアリダーゼ、 β -ガラクトシダーゼおよびヘキササミニダーゼの酵素処理により糖鎖末端をマンノースにした改変体。標的細胞であるマクロファージ表面に存在するマンノース受容体を介して細胞に取り込まれる。レセプターへの標的指向能、レセプター介在性のエンドサイトーシスを有する DDS 製剤と位置づけられる。

(2) 糖鎖改変型エリスロポエチン

・ Darbepoetin alfa ダルベポエチン アルファ (ネスプ[®])

5 カ所のアミノ酸置換により、天然の erythropoietin (EPO) に N 型糖鎖結合部位を新たに 2 カ所導入した改変体。天然の EPO には 3 本の N 結合型糖鎖と 1 本の O 結合型糖鎖が付加されているが、ダルベポエチンアルファでは、5 本の N 結合型糖鎖と 1 本の O 結合型糖鎖が結合している。結合糖鎖が増えることにより血中半減期が延長され、投与量・投与回数の削減が期待される。

2.3 PEG 結合型

(1) PEG 結合型インターフェロン

・ Peginterferon alfa-2a

ペグインターフェロン アルファ-2a (ペガシス[®])
インターフェロンアルファ-2a のリジン残基 (主な部位: 第 31 位, 第 121 位, 第 131 位, 第

134位)の1カ所に、1分子の分枝ポリエチレングリコール(分子量:約40,000)が、アミド結合を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約60,000)。血中半減期が従来の約10倍に延長されており、投与量・投与回数の削減、抗原性の低下が期待される。そのため、患者のコンプライアンスの向上に大きく貢献している。

・ Peginterferon alfa-2b

ペグインターフェロン アルファ-2b
(ペグイントロン[®])

インターフェロンアルファ-2bのアミノ酸残基(Cys¹, His⁷, Lys³¹, His³¹, Lys⁴⁹, Lys⁸³, Lys¹¹², Lys¹²¹, Tyr¹²⁹, Lys¹³¹, Lys¹³³, Lys¹³⁴, Ser¹⁶³およびLys¹⁶⁴)の1カ所に1分子のメトキシポリエチレングリコール(平均分子量:約12,000)がカルボニル基を介して共有結合している修飾タンパク質(分子量:約32,000)。血中半減期が延長されており、投与量・投与回数の削減、抗原性の低下が期待される。

(2) PEG 結合型顆粒球コロニー刺激因子

・ Pegfilgrastim (Neulasta[®])

大腸菌で生産されたG-CSF(フィルグラスチム)のN末端アミノ酸に、メトキシポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド(平均分子量:約20,000)を1分子結合させた修飾タンパク質。血中半減期が延長されており、投与量・投与回数の削減が期待される。

(3) PEG 結合型成長ホルモン誘導体

・ Pegvisomant ペグビソマント(ソマバート[®])

Human growth hormone(hGH)のアミノ酸配列を9カ所置換することにより、hGH受容体アンタゴニストとして作用するよう改変したタンパク質にPEG化を施した修飾タンパク質。タンパク質1分子あたり、4~6分子のPEG(分子量5,000)がLys残基に結合しており、体内安定性や血中滞留性の

向上が期待される。

2.4 融合タンパク質

・ Denileukin Diftitox (Ontak[®])

Diphtheria toxinの一部(Met1~Thr387)-HisとInterleukin 2(IL-2)の一部(Aln1~Thr133)からなる融合タンパク質。リンパ腫細胞表面のIL-2受容体に結合し、受容体リガンド複合体として細胞内に取り込まれる。IL-2受容体の発現細胞へのターゲティング能を有し、これらの細胞特異的にジフテリアトキシンによるタンパク質合成阻害に基づいた細胞死を誘導する。

・ Etanercept エタネルセプト(エンブレル[®])

ヒトTumor necrosis factor(TNF)受容体p75の細胞外のリガンド結合ドメインとヒトIgGのFc部分の融合タンパク質。細胞表面のTNF受容体へのTNFの結合を拮抗的に阻害する。Fc部分は血中半減期延長や可溶性受容体の二量化(リガンド【TNF】への親和性向上)の役割を持つ。

・ Alefacept (Amevive[®])

ヒトleukocyte function antigen 3(LFA-3)の細胞外領域であるCD2結合ドメインとヒトIgG1のFcドメインの融合タンパク質。CD2抗原を表面に発現しているTリンパ球に選択的に結合し、リンパ球の活性化を阻害する。

・ Abatacept (Orencia[®])

ヒトCTLA-4の細胞外ドメインとIgG1のFcドメインの融合タンパク質。抗原提示細胞(APC)上に存在するCD80/CD86分子に結合することにより、CD28分子を介したT細胞の活性化が阻害される。

3. 新たな機能性人工タンパク質の創出技術

従来から多くのバイオ研究機関が、特定レセプターへの親和性や選択性に優れた“生理活性タンパク質のアミノ酸置換体(機能性人工タンパク質)”を創製するため、Kunkel法などの点突然変異法を用いた構造変異体(アミノ酸置換体)の作製を精力的に試みている。しかし点突然変異法は、1つ1つのアミノ酸を置換した変異体を作製し、個々の変異体を別々に精製し機能評価しなければならぬため、莫大な時間と労力を要するうえ、評価できる変異体の数には実質的に限界があり、有効な変異体の効率的・効果的な作製とはいえなかった。それに対して近年、ファージ表面提示法を利用することにより 10^8 種類以上もの多様性を有した構造変異タンパク質(生理活性タンパク質のアミノ酸置換体)を一挙にCombinatorial Biosynthesisし、この構造変異体ライブラリーの中から、レセプター親和性や特異性などが向上した“機能性人工タンパク質”を迅速かつ効率よくスクリーニングできる基盤技術が開発されている。

ファージ表面提示法を用いたスクリーニングでは、ファージ表面にタンパク質を発現させ、固定化された標的分子と結合するファージを選別する操作を繰り返して、目的の結合特性を示すタンパク質を発現するファージを選択していく。また、選択されたファージを大腸菌に感染させれば、その培養上清中にタンパク質を発現させ、これを用いて、タンパク質の生物活性もハイスループットに評価することが可能である。さらに、培養上清というクルードなサンプルでは必ずしも評価できない発現タンパク質の物理化学的性質や生物学的性質を詳細に解析する必要がある場合には、発現させた変異体タンパク質を精製して評価を行うこともできる。

多数の変異体を評価できるという利点を活かし、

ファージ表面提示法を用いて、従来の方では見出すことのできなかった構造変異体の探索に成功した例として、腫瘍壊死因子(TNF)のリジン欠損体が報告されている²⁾。従来の点突然変異法を用いた構造-活性相関研究では、TNFのLys11やLys65・Lys90はその立体構造(三量体)形成やレセプター結合に必須と報告されていた。TNFに限らず、一般にリジン残基は多くの場合、生理活性タンパク質の高次構造形成やリガンド-レセプター結合などに必須の役割を担っているため、他のアミノ酸への置換は致命的な活性低下を招いてしまうことが、従来までの点突然変異解析によって常識となっていた。しかしファージ表面提示法を用いることで、Lys11やLys65・Lys90を含む全6個のリジン残基を一挙に他の様々なアミノ酸へ置換したタンパク質ライブラリーを構築することが可能となった結果、野生型TNFと同等さらには10倍以上もの生物活性を有するリジン欠損TNFを創製できることが判明した²⁾。この例では、TNFの6カ所のリジン残基を他の各種のアミノ酸に置換したTNF変異体ライブラリーをファージに導入し、固定化したTNF受容体への結合能を有するTNF変異体を発現しているファージをBiacore[®]を用いて選別、さらに、選別されたファージを感染させた大腸菌の上清を用いたバイオアッセイ(TNF感受性細胞に対する細胞傷害性試験)により、変異体の生物活性を評価している。リジン残基を置換しても活性を保持した変異体が得られた理由としては、リジンから置換されたアミノ酸が、TNFの活性保持に適したアミノ酸であったことが考えられる。従来の点突然変異法を用いた検討では、リジンをアラニンなどのアミノ酸に置換してTNFの活性が失われることを評価しているが、6カ所あるリジン残基をリジン以外のアミノ酸19種類に置換した変異体(19⁶種類)の機能を個別に評価することは現実的でないこともあり、活性を保持したリジン欠損体を見出す試みはなされていなかった。ファージ表面提示法を駆

見功損用やレに活ブ他てっ法む酸こら損は、酸ジををたイ生る。がアでをノ面々のもみ取

使することにより現在までに、TNF受容体サブタイプに選択的に結合する機能性人工TNFや、体内安定性に優れた機能性人工TNFも多数得られており³⁾、今後の研究の進捗に期待が持たれるところである。

このようなフェージ表面提示法を利用した機能性人工タンパク質の創出以外にも、ジーン・シャッフリング法や種々糖鎖修飾テクノロジーの開発が広く進められており、今後の“有効かつ安全なタンパク質性医薬品候補”の分子設計に寄与するものと考えられる。

4. 機能性人工タンパク質の品質・安全性確保

タンパク質性医薬品において薬効を期待される作用機構の代表的なものは、生体の恒常性維持機構の中で、本来、時空間的に厳密な発現制御のもとで発現・機能すべきであった当該タンパク質が欠損あるいは質的、量的に変化していることが発症の原因であった場合、あるいは疾患状態で質的、量的に変化したり欠損していくような場合に、これを補うというものである。そのような使用目的で開発されてきたものとしては、ヒトインスリン、グルカゴン、成長ホルモン、インスリン様成長因子、ナトリウム利尿ペプチド、グリコセレブロシダーゼ、エリスロポエチン、顆粒球コロニー刺激因子、血液凝固因子類などが典型的な例として挙げられる。その作用プロファイルがすでにほぼ明らかにされている天然型タンパク質と同等のものとして製造されたタンパク質性医薬品では、必要とされる品質が確保され、投与後の生体内濃度や作用局所さえ適正に制御できれば、一定の安全性を確保できるものと期待される。これに対して、天然のものとは異なる構造を持つ機能性人工タン

品質・安全性確保のための方策に加え、機能性人工タンパク質の特性に応じた個別の配慮が必要になる。

タンパク質性医薬品の品質・安全性等を確保するためには、まず申請しようとする製造方法を明らかにする必要がある。そして得られた原薬について、その構造・組成、物理化学的性質、免疫化学的性質、生物学的性質などの分子特性や安定性を最新の解析法を用いて詳細に解析するとともに、目的物質関連物質や目的物質由来不純物(定義については第3章概論およびICH Q6B参照)、製造工程由来不純物などの存在状況、感染性物質が存在しないこと、その他の汚染物質の存在実態等を含めた「品質特性」(定義についてはICH Q5Eを参照)を明らかにすることが必要である。また、製剤の製造方法と「品質特性」についても必要な情報やデータを明らかにする必要がある。その上で、臨床の場に、適切な品質を有する医薬品を恒常的に提供するための品質確保、品質管理の方策を講ずる必要がある。品質確保、管理のキープポイントは非臨床および臨床試験により有効性、安全性が評価された製品の「品質特性」をいかに継続して保証するかということである。その際、製品レベルでのロットごとの試験による保証(適切な規格・試験法の設定)と製造方法での保証(原材料や添加物などの品質管理、重要工程の一定性、プロセス評価・検証、プロセスコントロール・工程内管理試験など)を相互補完的にいかに合理的に組み合わせて品質確保策とするかが最大の課題となる。なお開発段階においては、非臨床および臨床試験により明らかになる有効性・安全性の解析結果と品質との関連を評価・検討し、望ましい品質を確保できるよう製造方法を最適化したり、品質の一定性を確保するための規格・試験法の改定を図ったりすることが必要な場合もある。試験法には、特性解析に用いた分析手法を適切に応用する。製品の安全性評価を行う際には、その「品質特性」から考えられる安全性上の懸念事項につ