

図 15 イオンモビリティ-質量分析機による加熱変性トラスツズマブのドリフトシフトパターン
トラスツズマブを各温度で 5 分間加熱し、加熱変性したサンプルをイオンモビリティ質量分析装置にて測定した

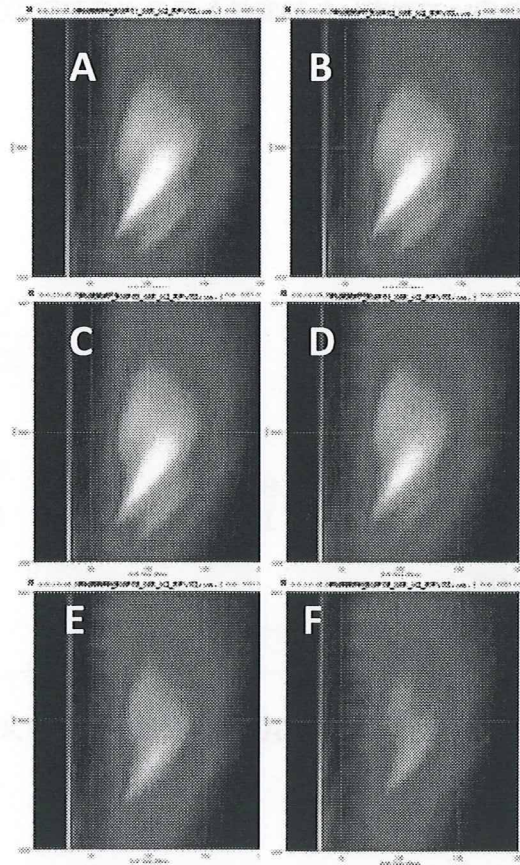


図 16 IM-MS を用いて測定した熱変性エタネルセプトのスペクトル

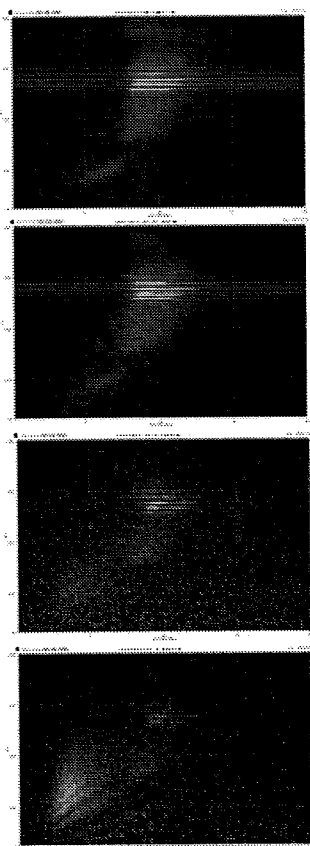


図 17 IM-MS を用いて測定した熱変性トラスツズマブのスペクトル

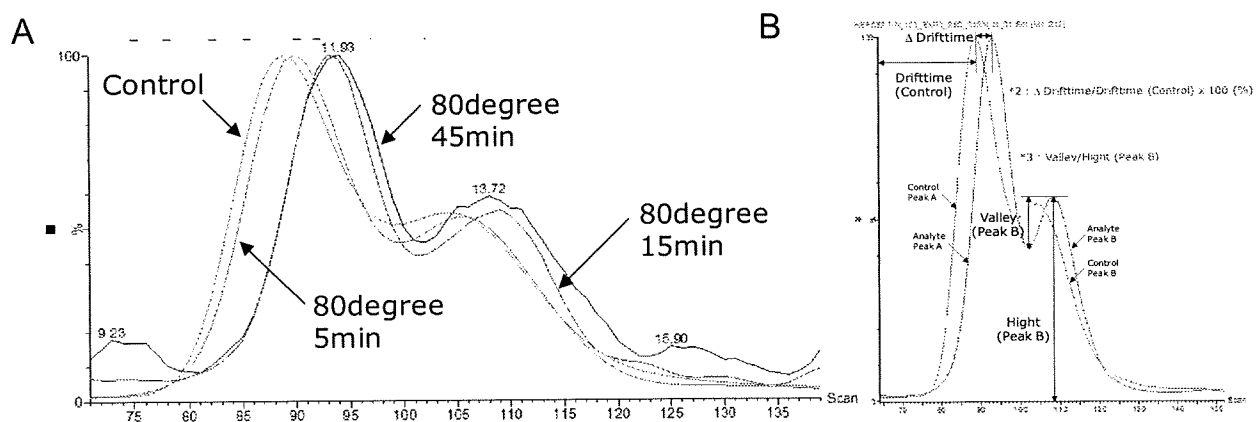


図 18 28+イオンに着目した、変性あるいは非変性トラスツズマブのモビリティ

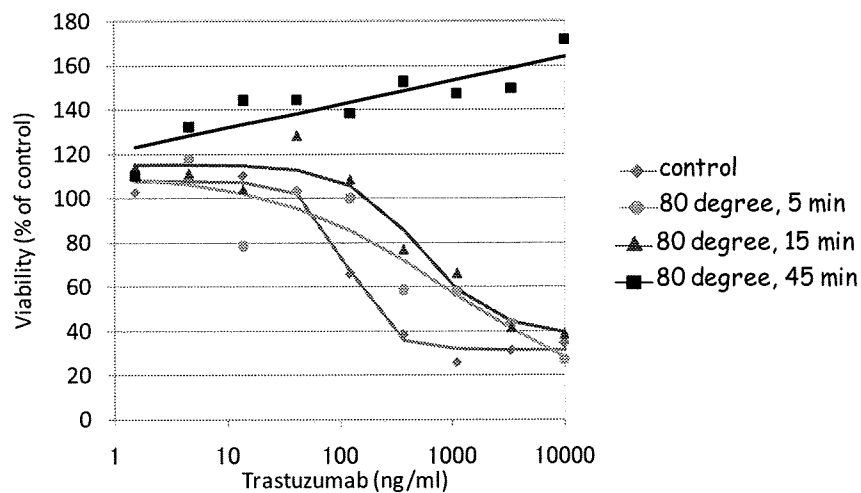


図 19 熱変性に伴うトラスツズマブの活性低下に及ぼす影響

表 8 トラスツズマブの活性変化とドリフトグラムの関係性

Sample	Activity		Driftgram similarity			Ion intensity (% vs Control)
	IC ₅₀ value (μg/ml)	Relative activity (% vs Control)	Δ drift time of Peak A (% vs Control)	Δ drift time of Peak B (% vs Control)	Valley of Peak B /Height of peak B	
Control	125.7	100.0	-	-	0.064	100.0
80 degree, 5 min	838.8	15.0	1.1 (1 scan)	1.9 (1 scan)	0.140	50.8
80 degree, 15 min	1045.2	12.0	4.5 (4 scan)	4.8 (4 scan)	0.286	12.3
80 degree, 45 min	(>10000)	(<1)	5.7 (5 scan)	3.8 (5 scan)	0.219	5.4

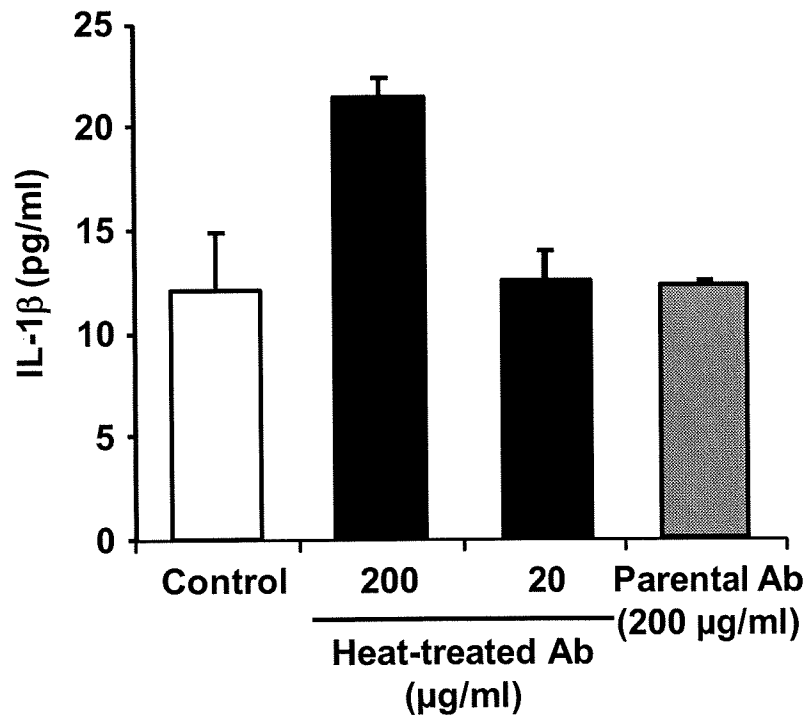


図 20 変性トラスツズマブの THP-1 細胞由来 IL-1β 産生に及ぼす影響

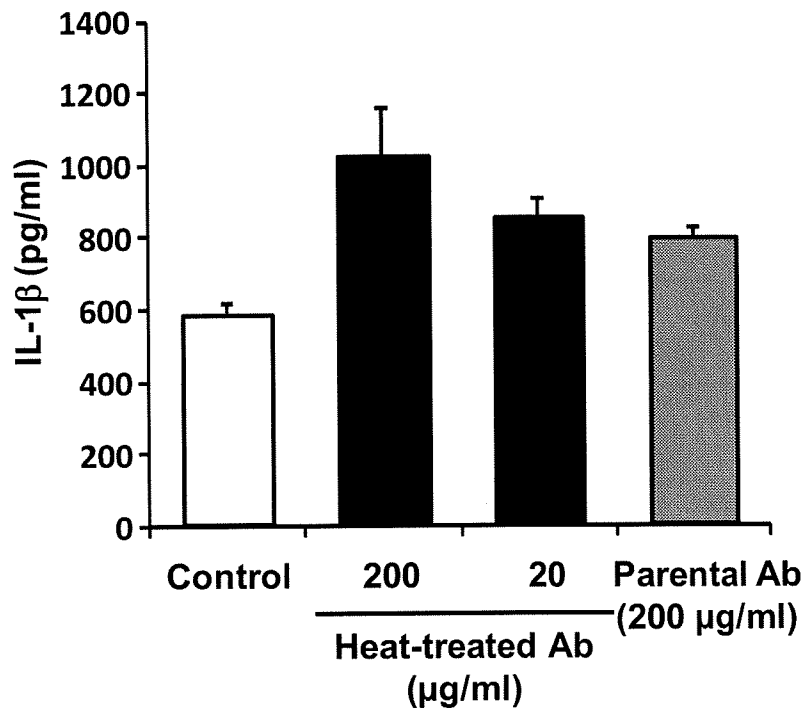


図 21 変性トラスツズマブの PMA 刺激 THP-1 細胞由来 IL-1β 産生に及ぼす影響

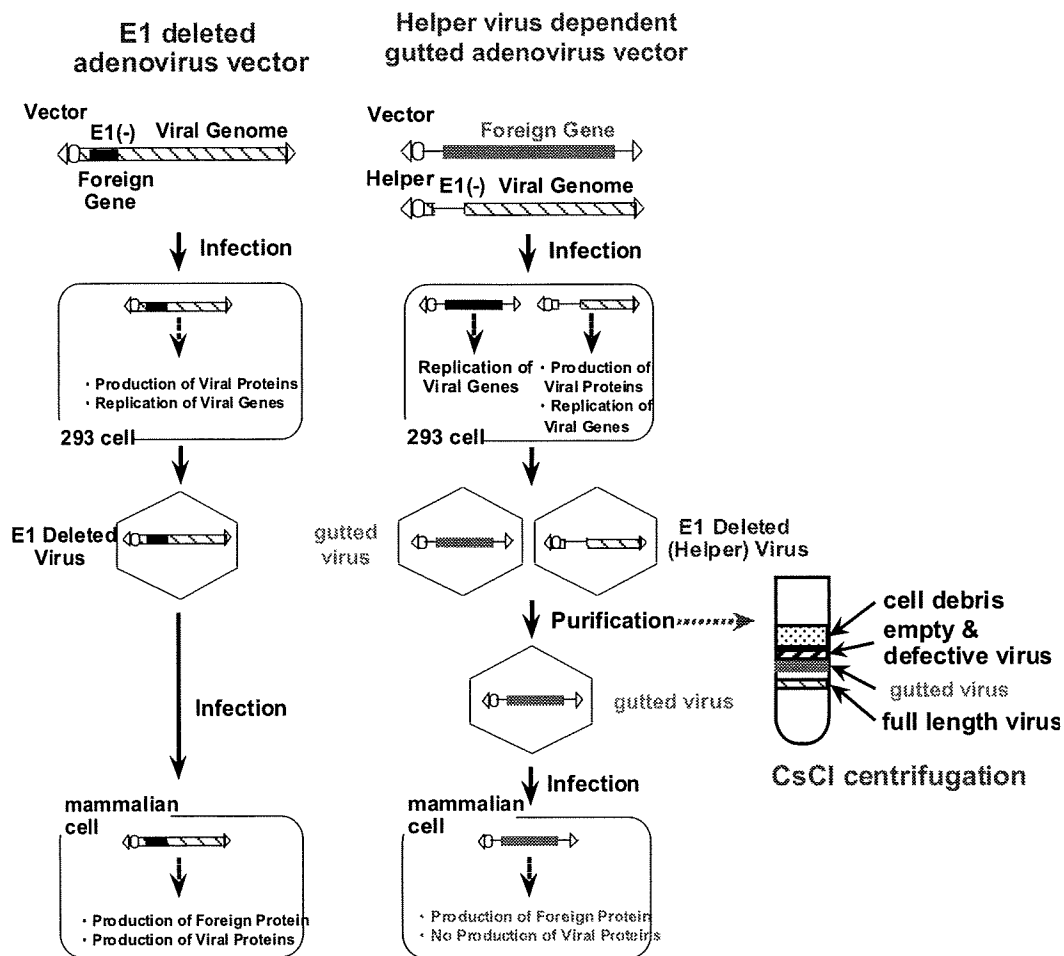


図 22 gutted アデノウイルスベクターの作成法

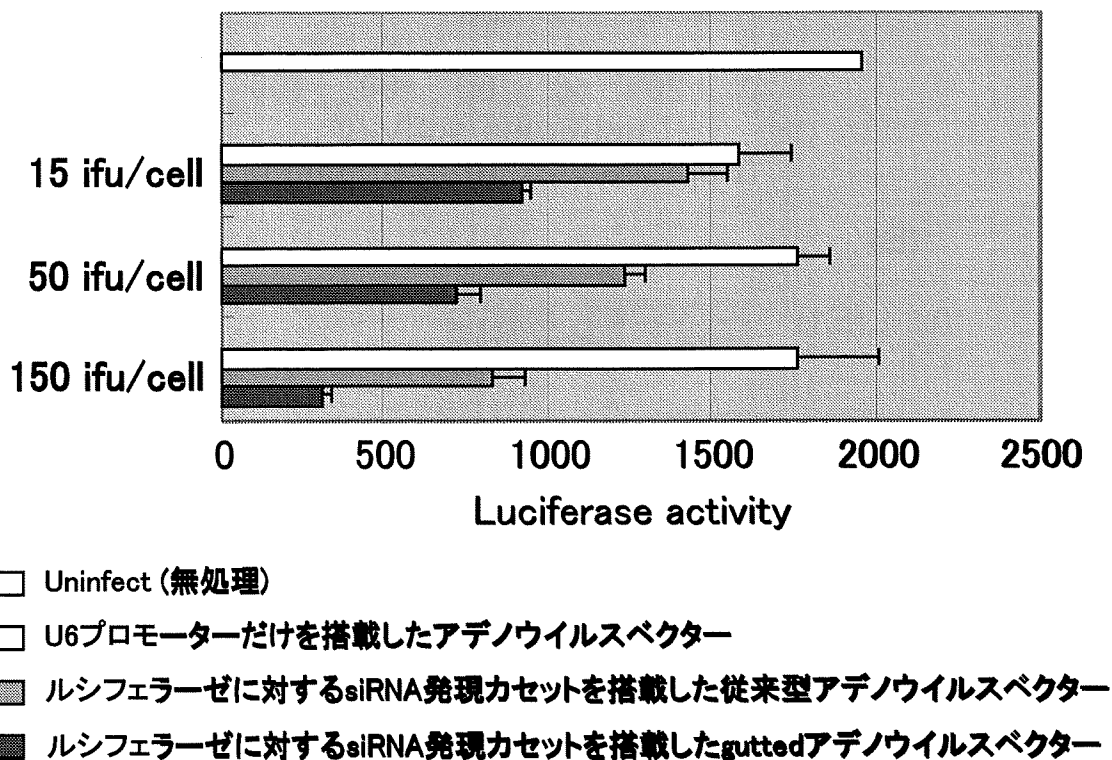


図 23 gutted アデノウイルスベクターによる RNA 活性の増強

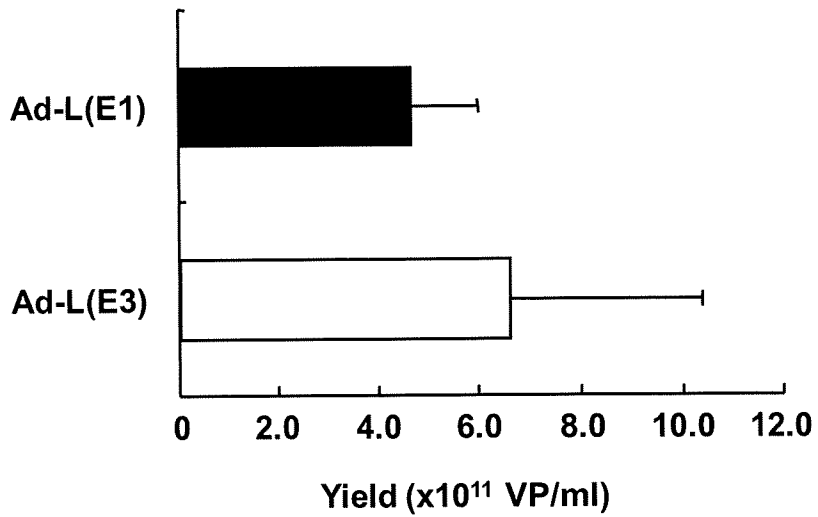


図 24 Ad-L(E1)と Ad-L(E3)の収率

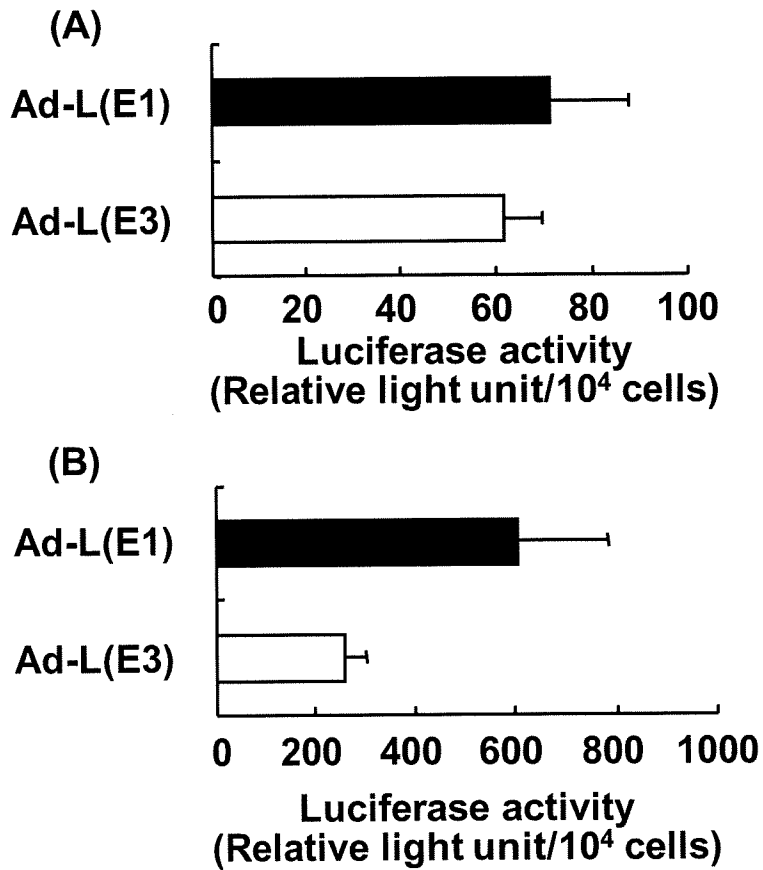


図 25 Ad-L(E1)と Ad-L(E3)にて添加したルシフェラーゼ活性の比較

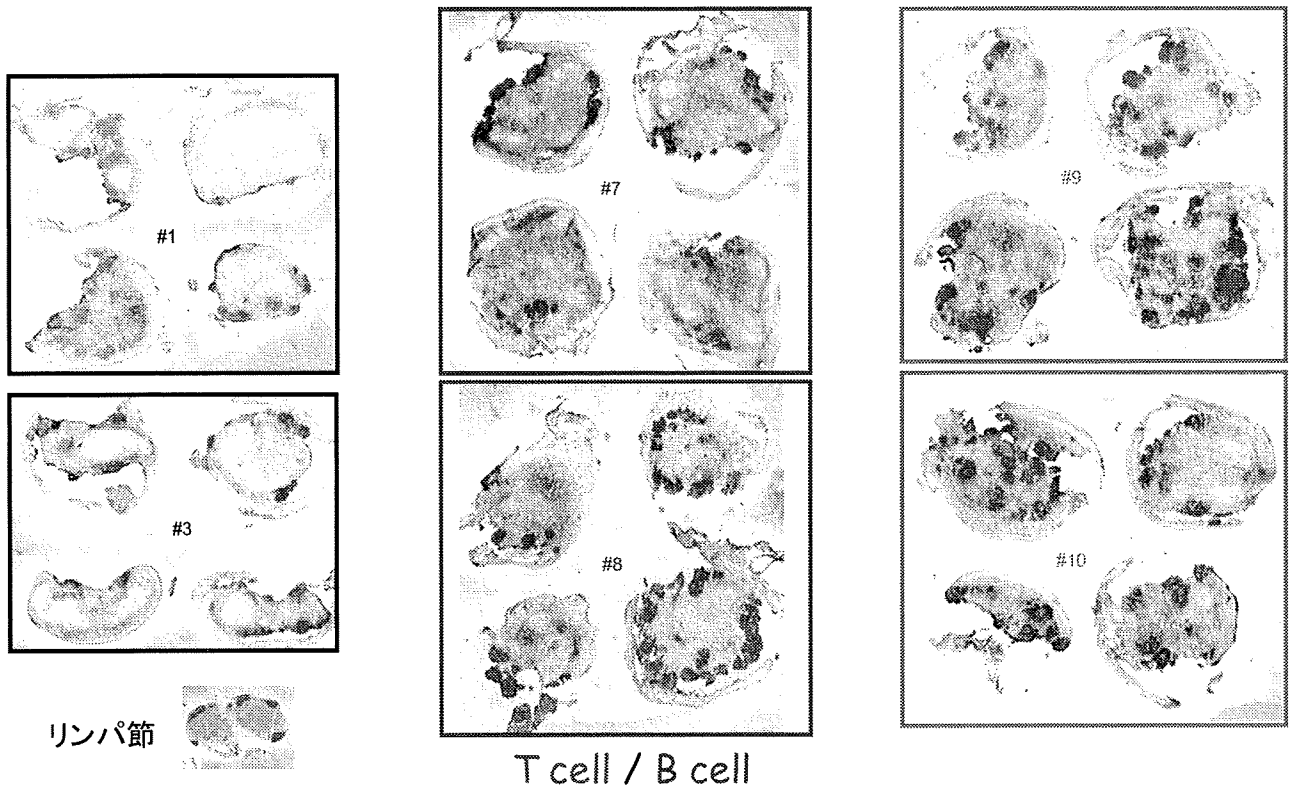


図 26 ストローマ細胞株によるリンパ球集積の差

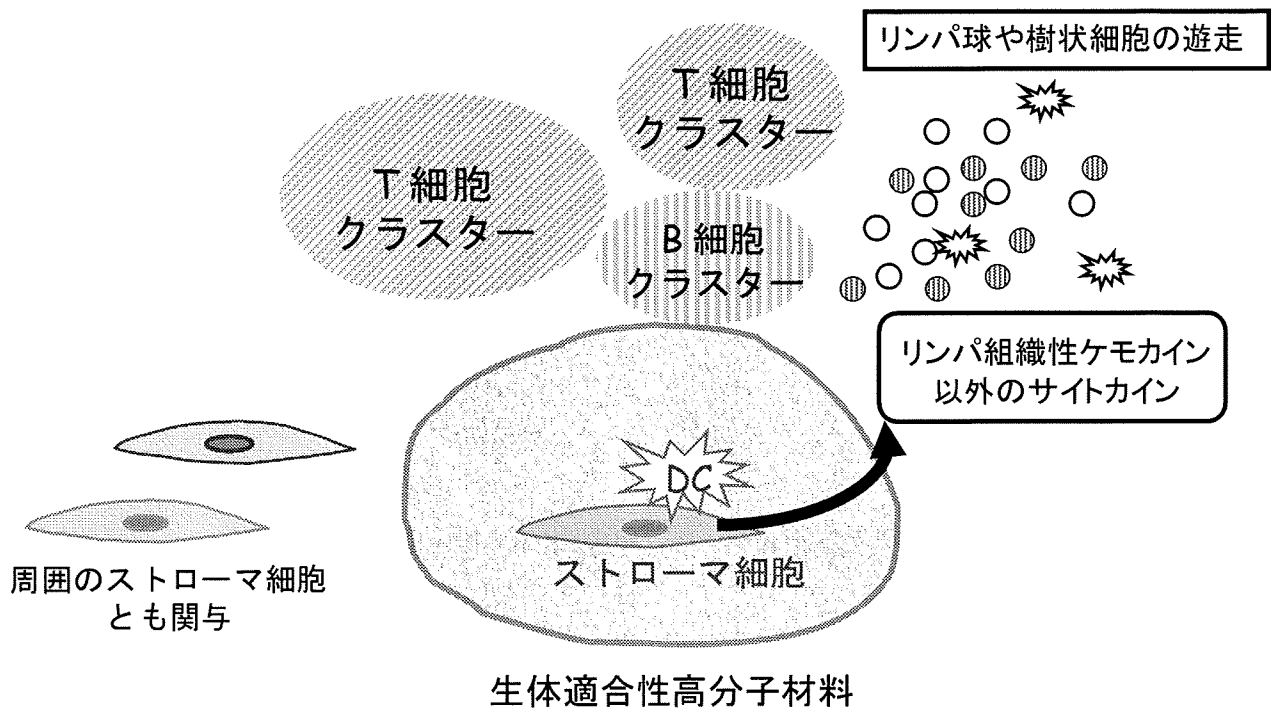


図 27 ストローマ細胞の重要性

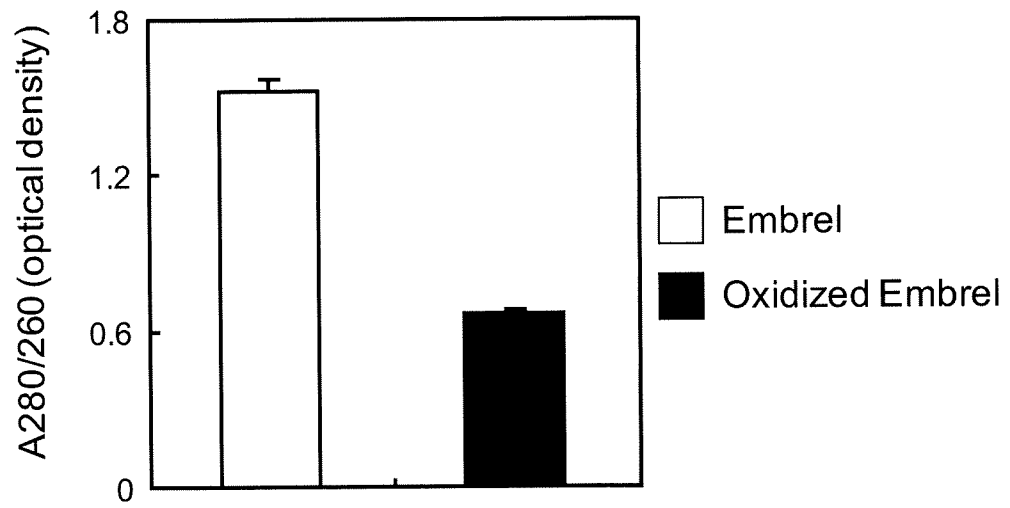


図 28 酸化処理によるエンブレルのタンパク質凝集

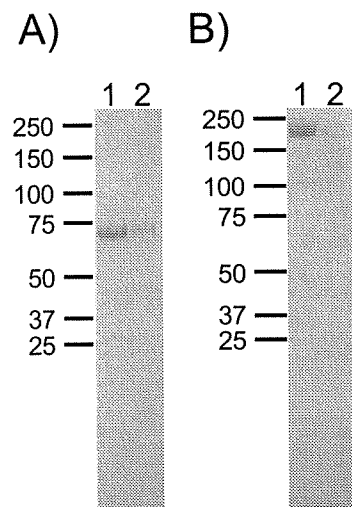


図 29 SDS-PAGE 解析 1. Embrel, 2. Oxidized Embrel

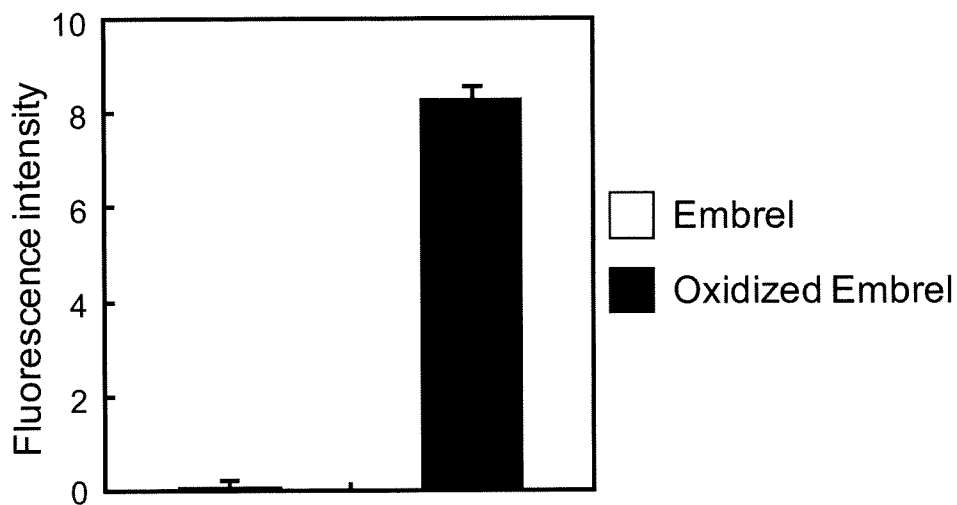


図 30 酸化変性エンブレルのチオフラビン T 染色

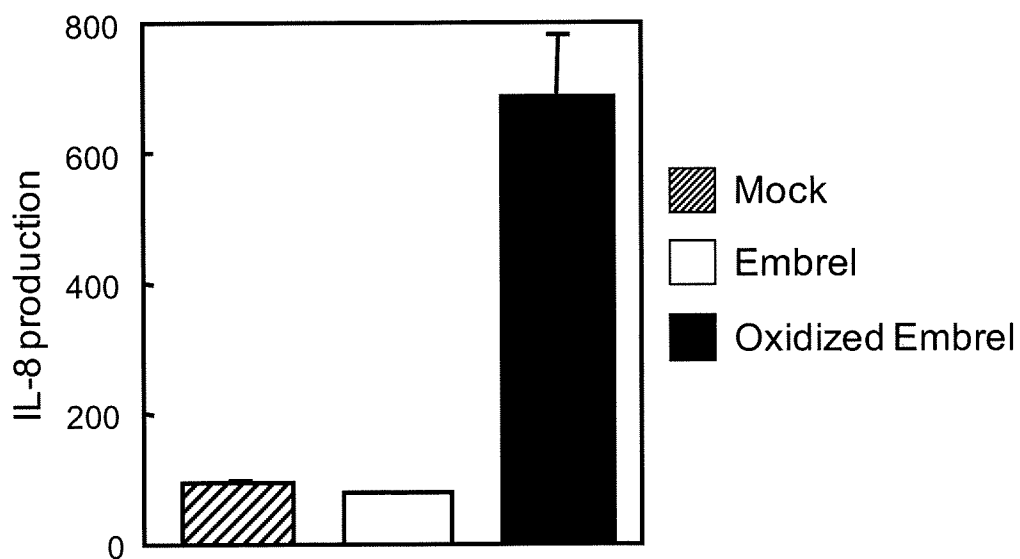


図 31 酸化変性エンブレルによる IL-8 の産生誘導

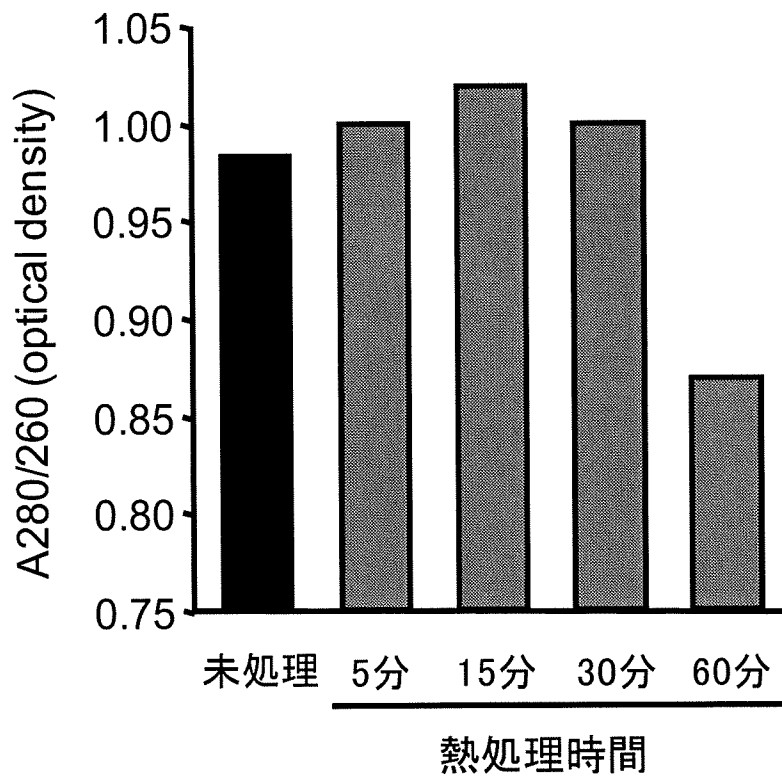


図 32. ハーセプチンの熱処理によるタンパク質変性.

ハーセプチンを 95℃で 5 分、15 分、30 分、60 分間熱処理し、タンパク質変性の 1 つの指標である OD280/260 を測定した。

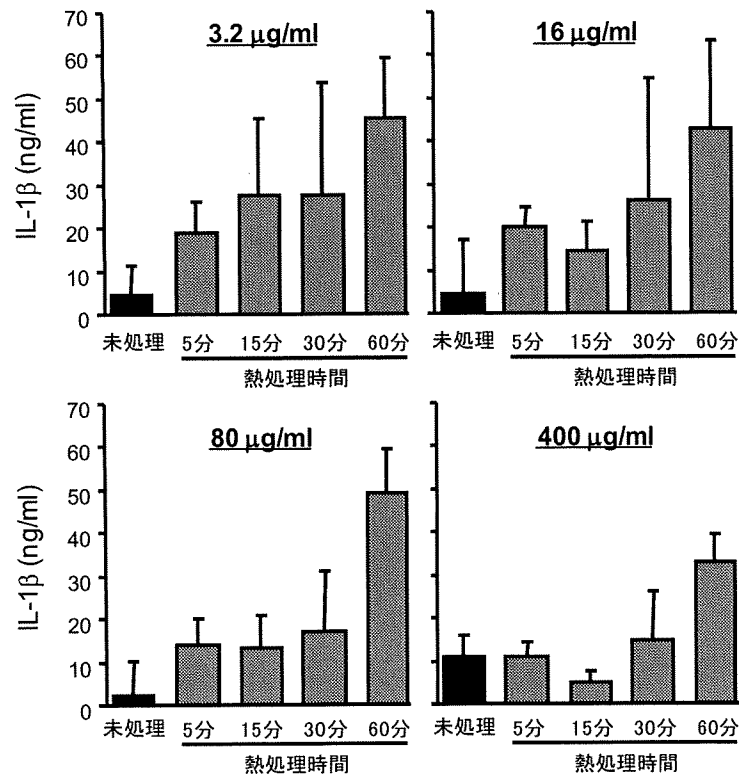


図 33. 熱処理ハーセプチンをマクロファージに処理した際に誘導される IL-1β量.

ハーセプチンを 95℃で 5 分、15 分、30 分、60 分間熱処理した後、各濃度のサンプルを THP-1 細胞に加えた。6 時間後に、培養上清中の IL-1β量を ELISA により測定した。

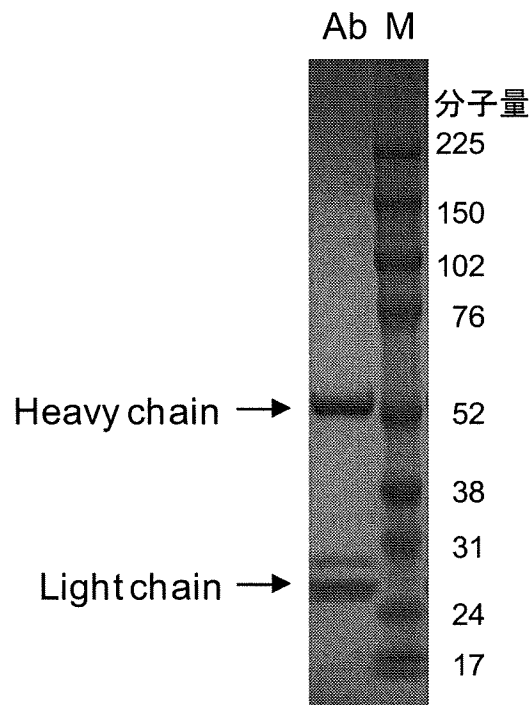


図 34. 精製抗 HLA-DR 抗体の SDS-PAGE 解析.

精製した抗 HLA-DR 抗体を SDS-PAGE し、クマシーブルー染色した。Ab ; 抗 HLA-DR 抗体、M ; プロテインマーカー

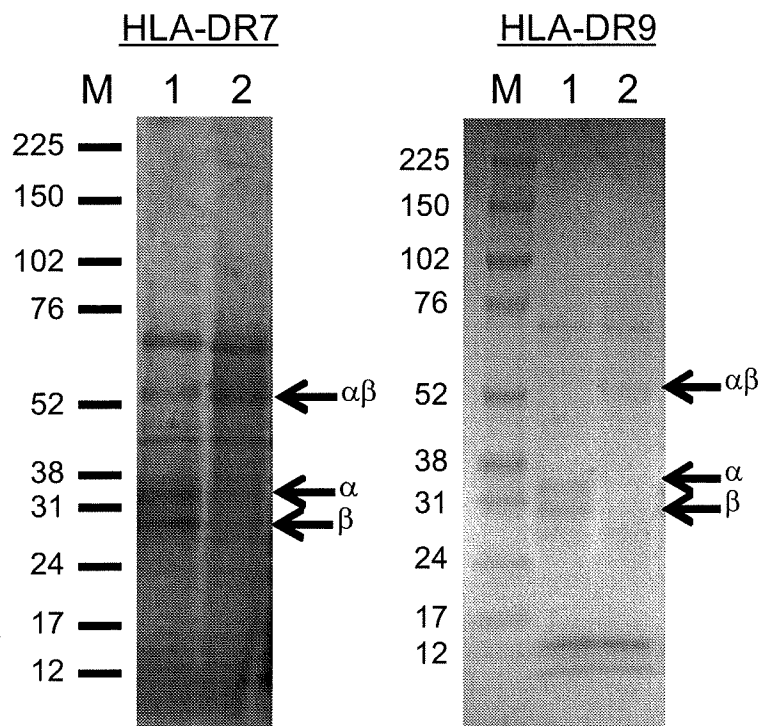


図 35. 精製 HLA-DR の SDS-PAGE 解析.

HLA-DR を SDS-PAGE し、クマシーブルー染色した。Lane 1 ; 還元剤存在下で加熱処理したサンプル、Lane 2 ; 還元剤存在下で非加熱処理のサンプル、M ; プロテインマーカー

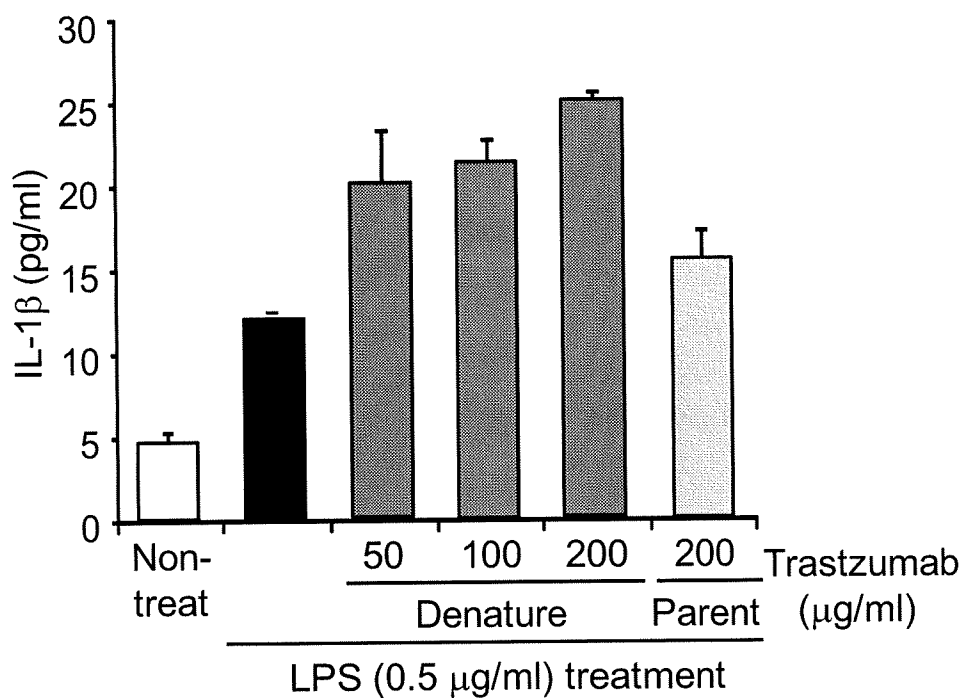


図 36. 熱処理したタンパク質製剤のマクロファージ様細胞に対する IL-1 β 産生への影響

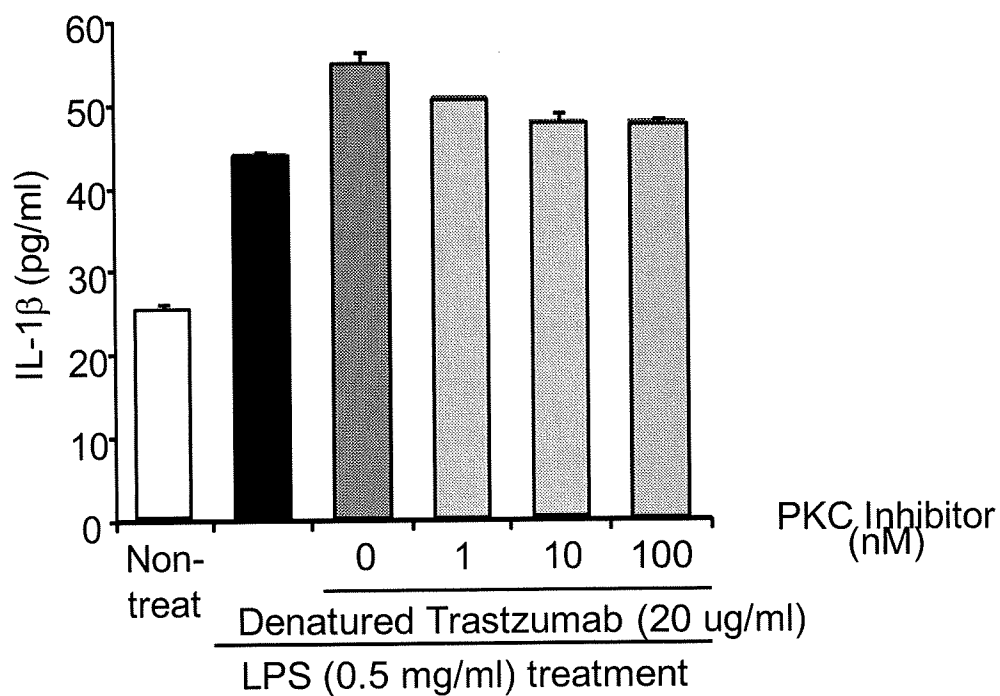


図 37. 熱処理トラスツズマブによる IL-1 β 誘導機構における PKC シグナルの関与

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	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	184-190
水口裕之、 早川堯夫	アデノウイルスベ クター	早川堯夫	バイオ医薬品 の開発と品質 ・安全性確保	(株)エル・ アイ・シ ー	東京都	2007	563-577
水口裕之	アデノウイルスベ クター	岡田弘晃	機能性 DDS キャリアの製 剤設計	(株)シ ーエムシ ー出版	東京都	2008	133-141
末松佐知 子	人工リンパ組織 構築とは何か		Organ Biology	日本臓 器保存 生物医 学会	東京都	2008	23-32
堤 康央	蛋白療法の最適 化に叶う創薬基 盤技術の開発と その評価	岡本浩一	Drug Delivery System	日本 DDS 学 会	神奈川県	2009	514-521
水口裕之	改良型アデノウ イルスベクター 開発の最前線		脳 2 1	金芳堂	京都府	2009	123-131
水口裕之	アデノウイルス ベクターの作 製・増幅・精製法		脳 2 1	金芳堂	京都府	2009	246-251

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.	Inflammation 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.	J. Immunol. Methods.	335(1-2)	71-78	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 of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction.	Br. J. Pharmacol.	153(6)	1143-1152	2008
Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus.	J. Mol. Biol.	380(5)	777-782	2008
Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system.	Pharmazie	63(10)	760-764	2008
Katakai T., Suto H., Sugai M., Gonda H., Togawa A., Suematsu S., Ebisuno Y., Katagiri K., Kinashi T., and Shimizu A.	Organizer-Like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs.	J. Immunol.	181(9)	6189-6200	2008

Imai S., Yoshida Y., Okamura T., Nagano K., Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	The specific effect of 2-Methoxyestradiol on lymphatic vascular endothelial cells.	Pharmazie	64 (3)	214-216	2009
Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y.	Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex	Acta. Crystallogr. Sect. F.	65 (Pt.3)	295-298	2009
Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y.	Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1- selective TNF mutant.	J. Mol. Biol.	385	1221-1229	2009

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、各種疾病の治療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、コンセンサスイン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* で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エタンパク質

分類	一般名	適応疾患	変位部位	付加された主な機能
アミノ酸配列変異型				
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	Reteplase	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
糖鎖変異型				
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	Darbeopetin alfa	貧血	アミノ酸置換によりN型糖鎖付加部位を2ヵ所追加	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ヵ所, 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ヵ所, 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ヵ所, 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(5 kDaのPEG, 4-6ヵ所, 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	LFA3+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