

博士論文（要約）

高分子ポリマーに対する蛋白質吸着の
溶媒効果に基づく機構解明

藤田（網谷） 梨紗子

【研究背景】

蛋白質吸着研究の歴史は、1960年代の Vroman の研究から半世紀にわたり盛んに行われてきた。蛋白質吸着の現象は様々なところで起こりうるが、意図していない望ましくない吸着は、活性低下の原因となることから回避すべき課題となる。例えば蛋白質分子は、液体や固体の境界面と様々な機序で干渉しあっており、物質的な安定性や生物学的活性に影響を与える。そのため蛋白質吸着は、医療分野において重大な課題の一つであり、特にバイオ医薬品において、製剤を入れる容器とその溶媒は、薬剤活性を保持する上で極めて重要な開発要素である。さらに医薬品のモダリティーは従来の低分子、抗体等のバイオ医薬品の他に、昨今では核酸、ペプチド等の中分子、あるいは再生医療（細胞）、遺伝子治療等多岐にわたり、多様性が広がっている。そのため、この分野の基礎研究の重要性が増しているといえる。

バイオ医薬品の主要な容器材料はガラスである。ガラスの利点は、透明性が高い、耐薬品性、低コスト、滅菌処理が可能であることが挙げられる。一方欠点として、プラスチックより重い、シリコンオイルコーティング、破損のリスクによるガラス片の混入等が挙げられる。そのため割れにくく扱いやすい素材としてプラスチックへの期待は大きい。その利点は、軽くて扱い易い、割れにくい、成型加工しやすいことが挙げられる。しかし欠点として、ガラスより透明性が劣る、そして何より吸着が激しいことが挙げられる。以上より、ガラスのように透明性が高く吸着が低い一方で、割れにくく、軽くて扱いやすい素材の需要が高まっている。以上の背景から、本研究では、低吸着性として知られている新素材のプラスチックとしてシクロオレフィンポリマー(COP)に着目した。

【研究目的】

COP は近年、生物学的製剤の容器として注目されているプラスチックの 1 種である。COP は、非環式構造を持つアモルファスのオレフィンポリマーであり、ガラスのような透明度、紫外線透過範囲、低吸湿性、滅菌処理可能、薬剤耐性等の優れた特徴を持っている。中でも注目すべき性質として低吸着性が挙げられる。一般的なプラスチックへの蛋白質吸着は、脱水和を伴う疎水性相互作用や Van der Waals 力が主要因であると考えられている。疎水性相互作用による蛋白質吸着は、しばしば蛋白質の構造変化や活性低下、さらには凝集を引き起こす。これらの凝集蛋白質は、ネイティブな蛋白質と比較して薬効が低くなり、時として免疫原性そしてアレルギー反応を引き起こすこともある。COP もまた疎水的な表面構造を持つ。にもかかわらず、他の典型的なプラスチックよりも低蛋白質吸着性という特徴を有している。しかしながら、この特徴を発現させるメカニズムは全く明らかになっていない。以上のように COP における低吸着性のメカニズムの解明は、蛋白質吸着の抑制戦略のための技術開発におけるパラダイムをシフトさせるために、そして、生物学的製剤パッケージングのための次世代材料を開発するために、極めて重要である。本研究は、COP 表面やその他の代表的なプラスチック表面と蛋白質間の相互作用機構を解明することを目的とした。

【解決策】

本研究では COP に対する蛋白質吸着について、他のプラスチックの代表であるポリスチレンやポリプロピレンと比較し検討することにした。COP 表面や他のプラスチック表面と蛋白質間の相互作用機構を解明するために、ホフマイスター系列（図1）に基づいた塩の種類と異なる塩濃度のバッファー条件下で、反射干渉分光法 Reflectometric Interference Spectroscopy (RIfs) と示差走査熱量測定 Differential Scanning Calorimetry (DSC) を用いて、蛋白質の吸着解析や物性解析を実施した。

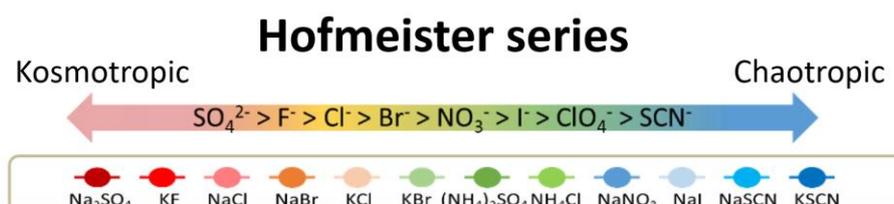


図1. ホフマイスター系列

【方法】

材料

Bovine serum albumin(BSA)と Carbonic anhydraseII (CAII) および抗 CD20 抗体リツキシマブ (リツキサン) を 50 mM Hepes、pH7.0、50 mM NaCl 含有バッファーで透析後、ゲルろ過クロマトグラフィーにて精製した。精製した溶液について、遠心式フィルターを用いて濃縮し、紫外線分光法にて濃縮溶液の蛋白質濃度を測定したものをストック溶液とした。

反射干渉分光法による蛋白質吸着実験

RIfs は、生体高分子の相互作用をラベルフリーで直接的にリアルタイムに検出できる高感度な技術である。測定機器 RIfs sensor MI-affinity (Konica Minolta Opto, Inc.(Tokyo, Japan)) に窒化ケイ素 (SiN) センサーチップとポリジメチルシロキサン (PDMS) フローセルを装着し、各塩を 500 mM 含んだ 50 mM HEPES バッファー(pH7.0)をランニングバッファーとして流した。各濃度 (1,10,100,1000 $\mu\text{g/mL}$) の蛋白質を、流速 100 $\mu\text{g sec}^{-1}$ で連続的に注入し、センサー上に流し、リアルタイムに波長シフト ($\Delta\lambda$) を測定した。

示差走査熱量測定

蛋白質の熱安定性は ultrasensitive VP-capillary microcalorimeter(Malvern, Japan)を用いて測定した。各蛋白質について、50 mM HEPES、pH7.0、50 mM の各塩で構成されたバッファーを用いて平衡化した。蛋白質濃度は 1 mg/mL に調製した。各サンプルについて、毎分 1°C の scan rate で 10°C から 100°C の間で熱処理を行った。データ解析は二状態モデルで ORIGIN7 を用いて実施した。

湿度解析

水分子の吸着測定は、RIfs、humidity generator GenRH-A とガスチャンバーを用いた。流速 100 $\mu\text{g/mL/sec}$ の窒素ガスを用いて 25°C でポリマーへの水吸着を行った。GenRH-A から生成された相対湿度は Spec View program でコントロールした。最初に相対湿度を 10% RH に設定し、湿度安定化を実施した後、10% RH で 30 分間浸漬した。その後 80% RH まで一時間毎に 300% RH ずつ上昇するようにプログラムし、80% RH で 30 分の浸漬時間で確認した。最後に 80% RH から 10% RH まで一時間毎に 300% RH 低下するように設定し、10% RH で 30 分間浸漬した。

【結果】

BSA を用いた塩濃度変化による吸着

抗体は各 2 本の重鎖と軽鎖がジスルフィド結合により会合した Y 字型蛋白質である。IgG は、最も上市品が多いバイオ医薬品である。BSA は固体表面吸着研究のモデル蛋白質として広く用いられ、 α ヘリックスを二次構造の主成分とする蛋白質である。まずは BSA を用いて塩濃度変化による吸着実験を行った。その結果、NaCl または Na₂SO₄ 濃度の上昇において、BSA の COP 表面への吸着が増加することが分かった。

BSA 吸着 ($\Delta\lambda$) と熱安定性 (T_m) の比較

Rifs を用いて測定した COP 表面と Pst 表面への BSA 吸着について、DSC より測定した熱安定性と比較した。その結果、COP に対する BSA 吸着は、熱安定性ととも増加することがわかった。一方 Pst 表面に対する BSA 吸着は、COP 表面ほどではないが、熱安定性と共に増加する傾向が認められた。

IgG 吸着 ($\Delta\lambda$) と熱安定性 (T_m) の比較

BSA と同様に、Rifs を用いて測定した COP 表面と Pst 表面への IgG 吸着について、DSC を用いて測定した熱安定性と比較したところ、IgG の COP 表面への吸着は、熱安定性と共に減少することが確認された。一方 Pst 表面への IgG 吸着は BSA 吸着と同様に、ホフマイスター系列に基づき Kosmotropic 溶媒環境下において、熱安定性が増し、吸着量が増加することが認められた。

湿度解析

Rifs を用いて異なる湿度環境下での COP と Pst 上の水層について調べた。COP の $\Delta\lambda$ は、10% RH と 80% RH の間で 0.02 nm を示したが、Pst と PP の $\Delta\lambda$ は、0.18 nm と 0.15 nm を示した。

【考察】

COP への BSA 吸着量は、kosmotropic 塩によって増加することが認められた。kosmotropic 溶媒は蛋白質の脱水和を引き起こすことが知られており、脱水和による疎水性表面の暴露により蛋白質吸着量が増加したと考えられる。一方で COP への IgG 吸着量は、chaotropic 塩によって増強されることが確認された。これは chaotropic 効果により蛋白質の分子内立体構造が不安定化し、柔軟性を持ったことにより疎水性残基が露出し、結果的に吸着量が増加したと考えられる。本研究より COP への蛋白質吸着は、ホフマイスター効果に強く依存していることが示された。一方で吸着量は高塩濃度にて増加すること、またいくつかの文献にて、蛋白質のゼータ電位はホフマイスター効果に依存しないことが報告されていることから、COP への蛋白質吸着においては、静電相互作用の寄与が主たる要因ではないと考えられる。

対照的に Pst への蛋白質吸着は、明確にホフマイスター効果に依存しているとは言えない結果であった。疎水的な固体表面への蛋白質吸着は、疎水性相互作用により生じるが、上述のとおり脱水和エネルギーもまた疎水的蛋白質吸着の重要な要因である。Pst 表面への蛋白質吸着のメカニズムは、プラスチックの疎水表面への吸着における典型的な現象として考察され、kosmotropic 環境が Pst 表面への蛋白質吸着を増加させると推測できる一方で、いくつかの過去の研究においては、蛋白質吸着が単純に kosmotropic 効果により増加するものではないことも報告されている。このことは本研究においても、同様の結果が得られている。

さらに Langmuir-Freundlich モデルを用いて算出した本研究データの吸着パラメーターにより、COP と Pst におけるホフマイスター効果の依存性と非依存性が各々で裏付けられ、COP への蛋白質吸着は

Pst 表面よりもより均質であることが実証された。この結果は **COP** への蛋白質吸着が、主として蛋白質と **COP** 間の直接的な相互作用であることを意味する。注目すべきことは **RIfs** と **SFG** 解析の両方を用いて、**Pst** 表面への水分子の結合は強いが、一方で **COP** 表面への水分子の結合は弱いことが明らかになったということである。これらの異なる水分子の挙動は、**Pst** 吸着のより複雑な現象に対して、**COP** 吸着は全く異なり、よりシンプルであることを示唆している。

【結論】

ホフマイスター効果を用いた吸着挙動における本研究結果は、非親水的に蛋白質吸着を抑制する戦略を論じる上で、そして **COP** 瓶を用いたバイオ医薬品の製剤化において、蛋白質に対する溶媒の取り扱いに基づいた新規の方法を提供する上で極めて重要である。今後、医薬品包装において、本研究の発見に基づいた次世代材料が開発されることを期待する。