

氏名	柳原 繁弘
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博甲第4147号
学位授与の日付	平成22年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Quality control and biological potency management of therapeutic recombinant human erythropoietin (医療用組換えヒトエリスロポエチンの品質および生物学的活性の管理)
論文審査委員	教授 沓掛 和弘 教授 上田 均 准教授 竹内 栄

学位論文内容の要旨

エリスロポエチンは、赤血球系前駆細胞の増殖・分化を促進して末梢血中の赤血球数を調節する分子量約 30000 の糖タンパク質である。遺伝子組換え技術を用いて生産された組換えヒトエリスロポエチン (rhEPO) は、慢性腎性貧血の治療薬として世界各国で使用されている。安全で有効性の高い医薬品を市場に供給するためにはその品質管理が重要であるが、複雑な糖鎖構造を有する rhEPO などのバイオ医薬品においては、臨床上の効果を反映する生物活性を正確に評価することが特に要求される。rhEPO の生物活性の評価には、*in vivo* 評価系、*in vitro* 評価系、酵素免疫定量法 (ELISA) などの免疫化学的評価系などが汎用されているが、これらの長所と短所を正確に把握した上で、適切な生物活性評価系を選択することが重要である。本研究では、rhEPO の品質管理における生物活性評価系の構築を行うとともに、生物活性を rhEPO の理化学的特性から推測する手法の有効性を検討した。

1. 抗 rhEPO モノクローナル抗体の取得と ELISA の構築

5 クローンのハイブリドーマ株を樹立し、各クローンから産生されるモノクローナル抗体 (mAb) の rhEPO に対する親和性および中和活性を評価した。その結果、5D11A と命名した mAb が rhEPO に対して最も高い親和性および中和活性を示すことがわかった。また、今回取得した mAb はエピトープの違いにより 2 グループに分けられ、一方は rhEPO の N 末端の 20 残基を、他方は rhEPO の立体構造を認識することが示唆された。5D11A は、rhEPO に対して非常に高い親和性と中和活性を有することから、生物活性を有する rhEPO を免疫化学的に検出するツールとして非常に有用であると考えられる。そこで、5D11A を固相化し、ビオチン化した抗 rhEPO ポリクローナル抗体を検出抗体とする ELISA を構築した。この ELISA は、生物活性を有する rhEPO 濃度を高い信頼性と再現性で定量できる試験系であることが示されたことから、rhEPO の品質管理に有用であると判断した。

2. rhEPO の生物活性をシアル酸付加数から推測する手法の有効性の検討

シアル酸付加数の異なる rhEPO アイソフォームを様々な比率で含む 18 の画分を調製し、その *in vivo* 活性を評価することにより、rhEPO の生物活性をシアル酸付加数から推測する手法の有効性について検討した。その結果、各 rhEPO 画分 1 分子あたりのシアル酸付加数 (SA/M) が大きい画分は *in vivo* 活性が高く、SA/M 値の減少にともなって生物活性の低下が認められた。一方で、SA/M 値が 12 以下の場合、SA/M 値がほぼ同等な画分間で *in vivo* 活性が 2 倍近く異なることが明らかとなった。SA/M 値と *in vivo* 活性との相関係数は 0.76 となり、以前他のグループから報告された組換えヒト卵巣刺激ホルモン (rhFSH) の場合の相関係数 0.95 に比べると、非常に低い値であった。したがって、rhEPO においては、シアル酸付加数の測定からその生物活性を評価することは困難であると結論された。rhEPO と rhFSH の糖鎖の割合はほぼ同じであるが、rhFSH は 2 本分岐型の N-結合型糖鎖が多い。4 本分岐型がほとんどを占め、複雑な糖鎖構造を有する rhEPO では、*in vivo* における活性は単純にシアル酸付加数のみに依存するのではなく、糖鎖の分岐構造などにも影響される可能性が高いものと推定される。

論文審査結果の要旨

エリスロポエチン (EPO) は、赤血球系前駆細胞の増殖・分化を促進して末梢血中の赤血球数を調節する分子量約 30000 の糖タンパク質である。遺伝子組換え技術を用いて生産された組換えヒト EPO (rhEPO) は、慢性腎性貧血の治療薬として世界各国で使用されている。本論文は、rhEPO の品質管理における生物活性評価系の構築と、生物活性を rhEPO の理化学的特性から推測することの有効性の検討結果について報告したものである。

第1章では、抗 rhEPO モノクローナル抗体 (mAb) の取得と特徴付けを記述している。5 クローンのハイブリドーマ株を樹立し、各クローンから産生される mAb の rhEPO に対する親和性および中和活性を評価した。その結果、5D11A と命名した mAb が rhEPO に対して最も高い親和性および中和活性を示すことがわかった。また、エピトープの違いにより mAb は 2 グループに分けられ、一方は rhEPO の N 末端の 20 残基を、他方は rhEPO の立体構造を認識することが示唆された。第2章では、後者に分類された 5D11A を用いて酵素免疫定量法 (ELISA) を構築した結果を記述している。この ELISA は、生物活性を有する rhEPO 濃度を高い信頼性と再現性で定量できる試験系であることが示されたことから、rhEPO の品質管理に有用であると考えられる。第3章では、rhEPO の生物活性をシアル酸付加数から推測する手法の有効性に関する検討結果を記述している。シアル酸付加数の異なるアイソフォームを様々な比率で含む rhEPO を分画し、その *in vivo* 活性を評価した。その結果、1 分子あたりのシアル酸付加数と *in vivo* 活性との相関係数は 0.76 となり、非常に低い値であった。したがって、シアル酸付加数からその生物活性を評価することは困難であると結論された。

このように、本研究は生物学および医学薬学上重要な糖タンパク質である EPO の品質管理について重要な知見を得たものであり、本論文は博士の学位論文として十分に値すると判断した。また、論文発表会や口頭試問での質疑に対する応答は適切であり、柳原繁弘氏は博士の学位を受けるのに十分な学識を有していると判断した。以上の点を総合的に判断し、審査員一同は合格と結論した。