

ポリエチレングリコール(PEG)は本当に安全か？

創薬科学研究教育センター・招聘(名誉)教授、薬学部同窓会長

松田 彰 (15期)

mRNA ワクチンの稿(芳香 SCIENCE 71-6)で述べましたが、標的蛋白質をコードする合成 mRNA は PEG 化脂質を含む脂質誘導体(脂質ナノ粒子、LNP)で包まれています。この PEG 化合物がワクチンの副反応に関与しているのではないかと一時騒がれましたが、詳しい因果関係は不明のままです。現在、多くの日用品や化粧品などに PEG 化合物が含まれているために既に我々の体の中に PEG に対する抗体(以下、積極的に PEG 化医薬品を投与しなくとも産生されている抗 PEG 抗体を**潜在的抗 PEG 抗体**と略します)ができています。それに対して、PEG 化医薬品を投与した際に産生される抗 PEG 抗体を**誘導性抗 PEG 抗体**と言うことにします。もし、潜在的抗 PEG 抗体があまりにも大量に産生されていて、それが PEG 化医薬品を投与した時に「悪さ」をすればもう PEG 化医薬品を開発することが出来なくなる可能性があります。以下にその点を含めて考えてみたいと思います。

さて、PEG とは何でしょうか？また、どんな時に使われるのでしょうか？表題に示したように PEG はポリエチレングリコール $-(CH_2CH_2O)_nR$ (一般的には $R = CH_3$ でこれを mPEG と略します)で、目的によって n が 45(分子量約 2 千)から 909(分子量約 4 万)のポリマーを直鎖や枝分かかれ型で 1 個から複数個を目的とする蛋白質・ペプチドや核酸に共有結合させて使います。PEG の酸素原子 1 個には平均 2-3 個の水分子が水素結合し、結合した化合物の水溶性を上昇させるとともに見かけの分子量を増大させます。従って、化合物の溶解性を上げたり、腎排泄を低下させたり(糸球体濾過抑制)、酵素(蛋白分解酵素や核酸分解酵素)・中和抗体の接近を妨げて安定性を増大します。また、非選択的な蛋白吸着(凝集)を抑制し食細胞による貪食を阻害し排泄を遅らせる効果もあります。PEG は、以前は免疫原性を示さないと考えられていましたが、多くの PEG 化合物が日常的に使われるにつれて重篤な過敏症が報告され始めています。また、長鎖の PEG 化合物は化学的に安定で、肝臓に蓄積すると言われてはいますが、その毒性については不明です。現在、日本では 10 種類以上の PEG 化蛋白質・ペプチド医薬品や PEG 化核酸医薬が臨床的に使用されており、それらの使用で誘導性抗 PEG 抗体が産生されますが、その問題を議論する前に、まず、潜在的抗 PEG 抗体を考えます。

1984 年の調査ではサンプル数 453 名の血液から 9 名(0.2%)に潜在的抗 PEG 抗体がすでに検出されていますが、2011 年では 350 名中 15 名(4.3%)になり、2016 年には 1310 名中 307 名(23.5%)に増加しています¹⁾。測定法や感度が異なっているので直接の比較は難しいのですが、上昇傾向にあるのは確かなようです。2016 年の台湾での調査では、2404 名中 1036 名(43%)に抗 PEG 抗体が検出され、IgM 型(26.4%)、IgG 型(25%)、両者(8.3%)に分布していました。IgM 型と IgG 型での男女比はいずれも女性 > 男性でした。これらの結果から、日常的に PEG 化合物が皮膚から吸収され、炎症を起し抗 PEG 抗体が生成していると考えられています²⁾。量的な分布も調べられており台湾での調査では IgG 型では 0.3-238 $\mu\text{g/mL}$ で平均値は 6.2 $\mu\text{g/mL}$ 、中央値は 2.1 $\mu\text{g/mL}$ でした。これらの抗体が PEG 化合物と結合すると、血中から PEG 医薬品が急速に排泄されることとなりますが、特に、潜在的抗 PEG 抗体量が多いヒトは要注意です。今回の mRNA ワクチン接種をした後に抗 PEG 抗体がどの程度増えているのかを知りたいものです。

さて、このような抗 PEG 抗体はどのように産生されるのでしょうか。あまり立ち入るとすごく複雑なのでごく簡単に説明します³⁾。PEG 化ヒト蛋白質の場合は、B 細胞受容体が PEG 部分を認識・内在化

して蛋白質を分解します。断片化されたペプチドの一部を MHC class II として細胞表面に提示すると、ある種のヘルパーT 細胞受容体がこれを認識して活性化され IgM から IgG へのクラススイッチが入ります。一方、PEG 化される蛋白質が異物(ヒト蛋白質ではない)の場合は、樹状細胞が蛋白質部分を認識して貪食し、分解されたペプチド断片は MHC class II として樹状細胞表面に提示されます。これを認識するヘルパーT 細胞は先と同様に活性化されます。すなわち、蛋白質がある場合は T 細胞依存的な免疫反応で抗 PEG 抗体が産生されます。一方、PEG 化核酸の場合は、蛋白質を持っていないので B 細胞上にペプチド断片を提示できません。従って、T 細胞非依存的な免疫反応で抗 PEG 抗体が産生されます。この時、骨髄系細胞や B 細胞—ヘルパー好中球が出す B 細胞活性化因子や増殖誘導性リガンドが PEG 部分を認識している B 細胞と結合して活性化する仕組みです。また、核酸部分が未修飾の場合は B 細胞の自然免疫系(トール様受容体)を活性化して発現を増強します。

PEG 化医薬品を投与した場合に産生される誘導性抗 PEG 抗体は、1) 投与した PEG 化医薬品の血中からの排泄促進や、2) 過敏症(特にアナフィラキシー)を起こすことが知られています。これらについて簡単に説明します。1) 血中からのクリアランス促進(ABC 作用、accelerated blood clearance): 例えば、肝臓のマクロファージである Kupffer 細胞は、肝臓内の毛細血管内皮細胞上に存在していますが、その表面には Fc 受容体や補体受容体などが発現しています。PEG 化医薬品の PEG 部分に結合した抗 PEG 抗体は、これらに結合して免疫複合体になり、Kupffer 細胞に貪食されることで ABC を起こします。2) アナフィラキシー: アレルゲンを投与後、数分～数時間以内に起きる重篤で生命を脅かす過敏反応のことを言い、具体的にはフラッシング、息切れ、顔面腫脹、頭痛、背部痛、胸部・喉の締め付け感、低体温・低血圧、死亡を起こします。これらの現象は、抗 PEG 抗体が PEG 部分に結合後、補体カスケードを活性化して、アナフィラトキシンである C3a や C5a を遊離し、血小板、マクロファージ、好塩基球、好中球上の Fc γ 受容体に結合して、ヒスタミン(血管拡張、血管透過性亢進、心拍数増加、心収縮)、セロトニン(大血管収縮、毛細血管拡張、血管透過性亢進、平滑筋収縮)、血小板活性化因子(PAF、気管支収縮、血圧低下、心拍出量低下)やシステニールロイコトリエン(CysLTs、炎症、気管支収縮、血管漏出)などを遊離するからです。また、自然免疫細胞の Fc 受容体を活性化したり、肥満細胞や好塩基球細胞上の Fc γ 受容体を活性化してヒスタミンを遊離する場合もあります。

このような、抗 PEG 抗体の好ましくない作用により問題になった PEG 化医薬品開発が過去にいくつも知られています。例えば、急性リンパ性白血病(ALL)は、アスパラギン(Asn)の生合成ができないので周りの正常細胞が合成した Asn を利用して増殖します。そこで、アスパラギナーゼ(アスパラギンをアスパラギン酸に分解)による ALL の治療が試みられました。大腸菌のアスパラギナーゼに 5 kDa の mPEG を多数結合した pegaspargase の臨床試験が行われましたが、小児の ALL 患者に投与したところ、急速な活性消失と抗 PEG 抗体の生成が極めて良い関連性があり、また、615 名中 79 名の臨床試験からの脱落がありました。

重篤な再発性慢性痛風の治療薬としてヒトにはないブタ尿酸分解酵素ウリカーゼに mPEG を結合し免疫原性の減弱を目論みました。しかし、皮下注射の臨床試験で 13 名中 5 名の患者に抗 PEG 抗体の生成が認められ、ABC が促進され、遅延性インフュージョン反応が出ました。なお、この医薬品は承認されましたが、EU では自主回収され現在では使用できません。このように、異物蛋白質を PEG 化して用いる場合は、抗 PEG 抗体が産生されやすいようです。

血液凝固系の阻害剤は、依然として大きな需要があり、ファクターXa (FXa) の阻害剤が 2020 年の世界で最も売れた医薬品のトップ 20 の2位と4位を占め、合計の売上は3兆2千億円にもものぼりました。しかし、FXa を阻害しすぎると出血傾向がでて臨床的には使い難い薬の一つだそうです。2002 年米国 Duke 大学の BA. Sullenger らは、FIXa に対する阻害性アプタマー-9.3t (FIXa に結合し活性を阻害できる核酸分子)とそのアプタマー-9.3t に相補的に結合し阻害効果を解除できる antidote を開発しました³⁾。アプタマー-9.3t は、34mer の部分的に化学修飾したオリゴボヌクレオチドですが、分子量が 1 万強と小さいために、分子量 40 kDa の mPEG を 5'末端に結合し PEG-9.3t としました (図1)。一方、antidote は 17mer の 2'-OMe 修飾したオリゴボヌクレオチドです (PEG 化はしていません)。血液凝固しつつあるマウスに PEG-9.3t を静脈注射すると直に凝固が解除され、それが不必要になったときに antidote を注射し出血傾向に陥らないように調節できるというアイデアです。更に血中安定性を増して pegnivacogen (RB006) (図1)として臨床試験が行われました。Phase 2b 試験では、41名中3名に重篤な副作用がでて試験が中止になりました⁴⁾。さらに、経皮的冠動脈形成中の出血を既存薬との比較するための Phase 3 試験は、北米・欧州で 13,200 名の患者をリクルートした大掛かりなものでしたが、1,616 名の患者が終了した時点で 10 名 (0.6%) に重篤なアレルギー反応が出て試験自体が中止になりました⁵⁾。このアプタマーは、十分に化学修飾されていて血中安定性のみならず自然免疫活性化の回避が行われています。しかし、ごく少数の患者ですが重篤なアレルギー反応が出るほど潜在的抗 PEG 抗体を多く持っていたと考えられています。

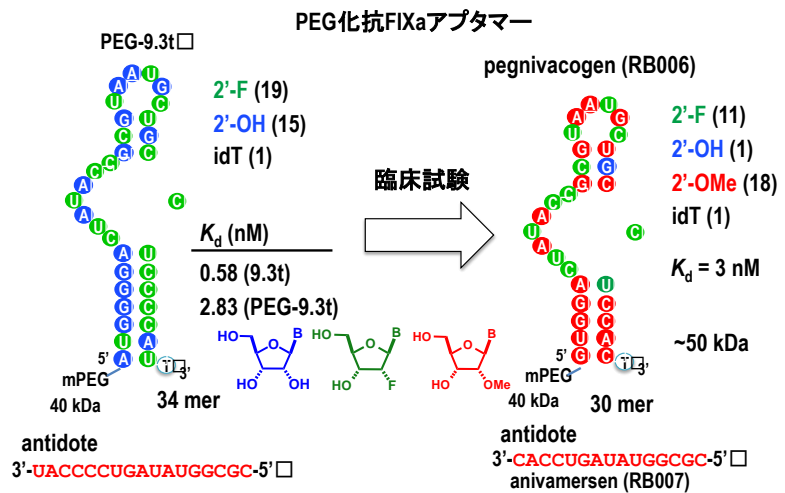


図1 抗 FIXa アプタマーとその antidote の構造

アプタマーは、核酸抗体とも呼ばれ、現在では比較的容易に作成可能で治療薬として応用が可能です。糸球体濾過に抵抗するほどの高分子量ではないために、血中滞留性を高める工夫が必要です。すでに、VEGF に結合する PEG 化アプタマー (pegaptanib, Macugen) が加齢性黄斑変性症治療薬として使用されていますが免疫が弱い眼球に直接注射するためにアレルギーが問題にはなっていません⁶⁾。

最後に、少し化学的なこと (抗 PEG 抗体の構造認識と PEG の形) を述べてこの稿を結びたいと思います。実は、抗 PEG 抗体には大きく分けて2種類あり、主な抗体は PEG の骨格を認識しますが、PEG の末端構造だけを認識する抗体もあります。骨格を認識する抗体は、メチレン鎖を長くしても、エチレングリコールをエステルで繋いでも結合しますので、CH₂CH₂O 部分を認識していると考えられています。末端を認識する抗体は、最も多用されている-OCH₃ を認識しますが、他の-O アルキル体 (エチル、ブチル、t-ブチル体) でも結合します。末端-OH 体や-NH₂ 体の認識はかなり弱いようですが、骨格を認識する抗体には普通に認識されます。

PEG 化合物は、かなり柔軟なポリマーで色々な形をとりうると考えられています。しかし本当でしょうか。最近、抗 PEG 抗体 (Fab) に結合した PEG の構造が明らかになりました^{7,8)}。PEG は、結合する抗体の芳香族性および疎水性の側鎖に囲まれて安定化していますが、PEG の酸素原子と水素結合している主鎖・側鎖はほとんどなく、専ら van der Waals 力で相互作用しているようです。結晶化の際に 18-クラウン-6 (18-c-6) を添加するとクラウンエーテルの6個の酸素原子は Lys 側鎖ε-アンモニウム基を取り囲むような相互作用をしています。PEG 分子は、一部欠損した 18-c-6 が二個結合し全体として S 型構造をとり、Fab 抗体の二量化に寄与しています。その時、エチル基の両側の酸素原子はゴーシュ型を好み、18-c-6 と同様の立体配座とります。炭素—酸素結合の炭素原子の後ろ側にあるエネルギーの低い空の σ^* 反結合軌道は、近くにある孤立電子対や σ 軌道のような電子供与性官能基からの電子対を受容するからです (図 2)。このように PEG はゴーシュ効果によってそんなに柔軟な構造はとれないのではないかと考えています。

今後とも糸球体濾過されるような分子量しか持たない蛋白質 (ペプチド) や核酸医薬の開発が続くと思われます。しかし、それらは直に腎排泄されるために作用時間が短く目的に合わないことが多いかもしれません。今は、それらを解決する常套手段が PEG 化ですが、潜在的抗 PEG 抗体量がさらに増加し、PEG 化が使えない状況が多発することが現実になるかもしれません。従って、PEG に代わる新しいポリマーの開発⁹⁾ やそれに代わる新しい仕組みの開発が緊急の課題です。

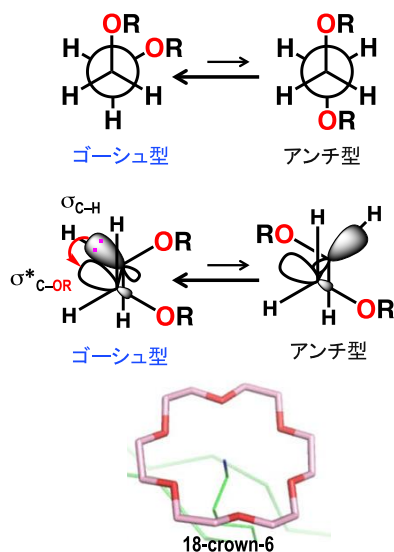


図 2 PEG の形

- 1) B-M. Chen, T-L. Chen, SR. Roffler, *ACS Nano*. 15, 14022-14048 (2021).
- 2) B-M. Chen, et al. *Anal. Chem.* 88, 10661-10666 (2016).
- 3) CP. Rusconi, et al. *Nature* 419, 90-94 (2002).
- 4) NJ. Ganson, et al. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 1610-1612 (2016).
- 5) AM. Lincoff, et al. *Lancet* 387, 349-356 (2016).
- 6) EWM. Ng, et al. *Nature Rev. Drug Discov.* 5, 123-132 (2006).
- 7) C-C. Lee, et al. *J. Biomed. Sci.* 27, 12 (2020).
- 8) JT. Huckaby, et al. *Commun. Chem.* 3, 124 (2020).