

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	抗PEG抗体アッセイに向けたセロオリゴ糖集合体の設計と構築
Title(English)	
著者(和文)	杉浦開
Author(English)	Kai Sugiura
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第318号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:芹澤 武,穴戸 厚,戸木田 雅利,田中 祐圭,澤田 敏樹
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第318号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	応用化学 応用化学	系 コース	申請学位（専攻分野）： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	杉浦 開		審査員主査： Chief Examiner	芹澤 武

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

近年、抗ポリエチレングリコール (PEG) 抗体によって引き起こされる PEG 修飾医薬の薬効ならびに安全性の低下が大きな問題となっている。抗 PEG 抗体の分析には酵素結合免疫吸着測定 (ELISA) 法が広く用いられてきたが、固相担体の材料設計が必ずしも十分ではなく、抗 PEG 抗体の結合特性は未解明な点が多い。本論文では、オリゴエチレングリコール (OEG) 鎖を自在に提示できるセロオリゴ糖集合体を設計するとともに、それらの ELISA 法の固相担体としての有用性を明らかにすることを目的とした。

第一章「序論」では、本論文の背景と目的について述べた。

第二章「酵素触媒重合法により構築した OEG 導入セロオリゴ糖集合体による抗 PEG 抗体の識別」では、酵素触媒重合法を利用して OEG 導入セロオリゴ糖集合体を構築し、それらを用いた ELISA 法により抗 PEG 抗体をアッセイすることを目的とした。セロデキストリンホスホリラーゼを触媒とした酵素触媒重合法により、エチレングリコール (EG) ユニット数が 2、4、6、および 8 の OEG を表面にもつセロオリゴ糖集合体をそれぞれ構築した。OEG 導入セロオリゴ糖集合体のタンパク質吸着特性を評価した結果、それら表面に対するタンパク質の非特異的な物理吸着の量が極めて少ないことが明らかとなった。OEG 導入セロオリゴ糖集合体を用いた ELISA 法により、結合特異性の異なる 3 種類のモノクローナル抗 PEG 抗体をアッセイした結果、末端のメトキシ基とそれに結合した 3 個の EG ユニートを認識して結合するとされている抗 PEG 抗体を特異的に検出できることが明らかとなった。抗 PEG 抗体の検出量は OEG 鎖長に応じて変化することが明らかとなり、これは隣接した OEG 鎖の排除体積効果によるものであると考えられる。血清が共存する条件下で抗 PEG 抗体濃度を変化させてアッセイした結果、抗 PEG 抗体を定量的に検出できることが明らかとなった。定量できる抗 PEG 抗体の濃度範囲は臨床で求められている濃度域をカバーしていたことから、本 ELISA 法が生体試料中の抗 PEG 抗体の分析に利用できる可能性が示唆された。以上より、セロオリゴ糖集合体を固相担体として用いた ELISA 法が抗 PEG 抗体のアッセイに有用であることを明らかにした。

第三章「酵素触媒重合法とポスト機能化法により構築したセロオリゴ糖集合体を用いる抗 PEG 抗体のアッセイ」では、酵素触媒重合法とポスト機能化法を利用して OEG が導入されたセロオリゴ糖集合体を構築し、それらを用いた ELISA 法により、結合特異性の異なる抗 PEG 抗体をそれぞれアッセイすることを目的とした。セロデキストリンホスホリラーゼを触媒とした酵素触媒重合法により、プロパルギル基を表面にもつセロオリゴ糖集合体を構築した。プロパルギル基をもつセロオリゴ糖集合体のタンパク質吸着特性を評価した結果、その表面に対するタンパク質の非特異的な物理吸着の量が極めて少ないことが明らかとなった。クリック反応に基づくポスト機能化により、EG ユニット数が 3、7、11、および 23 の OEG を、プロパルギル基をもつセロオリゴ糖集合体の表面に導入率を制御しながら導入することができた。OEG 導入集合体を全原子分子動力学シミュレーションした結果、OEG 鎖がセロオリゴ糖集合体表面に安定に提示されることが示唆され、抗 PEG 抗体は OEG 鎖と相互作用できると考えられる。OEG 導入集合体を用いた ELISA 法によるアッセイを実施した結果、結合特異性の異なる 3 種類のモノクローナル抗 PEG 抗体をそれぞれ検出できることが明らかとなった。さらに、クローン 15-2b 抗 PEG 抗体が末端のメトキシ基と 7 個以上の EG ユニートをもち OEG に結合することが見出された。また、OEG 導入率が 7、21、および 55% の OEG 導入集合体を用いたアッセイの結果、OEG 導入率が 21% の場合に、抗 PEG 抗体の検出量が最大となった。この検出量の変化は OEG 鎖のコンフォメーションの違いによるものであると考えられ、全原子分子動力学シミュレーションにより、セロオリゴ糖集合体表面の OEG 鎖のコンフォメーションを評価した。その結果、OEG 鎖のコンフォメーションは導入率が高くなるにつれて伸長することが示唆された。導入率が 7% から 21% までは OEG 鎖の伸長により、抗 PEG 抗体との結合が促進されると推察された。一方、55% の場合には、隣接した OEG 鎖の排除体積効果によって抗 PEG 抗体と OEG 鎖との結合が阻害されると推察された。血清が共存する条件下で抗 PEG 抗体濃度を変化させてアッセイした結果、結合特異性の異なる 3 種類の抗 PEG 抗体をそれぞれ定量的に検出することができた。以上より、設計可能なセロオリゴ糖集合体が抗 PEG 抗体のアッセイのための固相担体として有用であることを明らかにした。

第四章「結論および今後の展望」では、本論文の結論と今後の展望について述べた。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東京科学大学リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Science Tokyo Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	応用化学 応用化学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	杉浦 開		審査員主査： Chief Examiner	芹澤 武

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Recently, anti-poly(ethylene glycol) (PEG) antibodies have become a major concern due to their concern to reduce the therapeutic efficacy and safety of PEGylated drugs. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is one of the most frequently used methods for analyzing anti-PEG antibodies. Nevertheless, revealing the binding characteristics of anti-PEG antibodies is still a challenge. In this thesis, I designed cello-oligosaccharide assemblies as a solid-phase platform to conjugate oligo(ethylene glycol) (OEG) chains for ELISA of anti-PEG antibodies.

In chapter 1, the background and the objective of this thesis are described.

In chapter 2, OEG-tethering cello-oligosaccharide assemblies were synthesized via cellodextrin phosphorylase-catalyzed oligomerization reaction. The OEG-tethering assemblies had antibiofouling properties against nonspecific protein adsorption. ELISAs using the OEG-tethering assemblies revealed that anti-PEG antibodies were successfully distinguished by specificity for the PEG terminus. Furthermore, the quantitative detection was performed even under the conditions with serum.

In chapter 3, propargylated cello-oligosaccharide assemblies were synthesized via cellodextrin phosphorylase-catalyzed oligomerization reaction. The protein adsorption amount on the assemblies was very low level. A series of OEG-conjugated assemblies with varying conjugation rates and chain lengths of OEG chains were prepared using click reactions. ELISAs using the OEG-conjugated assemblies allowed for detecting three species of monoclonal anti-PEG antibodies. Notable results were obtained for one anti-PEG antibody (clone 15-2b); although 15-2b had been reported to bind to terminal methoxy OEG chains with 12 repeating EG units but not to those with 8 repeating EG units, the ELISAs using the OEG-conjugated assemblies revealed that 15-2b bound to terminal methoxy OEG chains with 7 or more repeating EG units. Additionally, the quantification of anti-PEG antibodies was successfully demonstrated even in the presence of serum.

In chapter 4, conclusions and future perspectives of this thesis are described

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東京科学大学リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Science Tokyo Research Repository Website (T2R2).