

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14457

研究課題名(和文) 蛍光超遠心分析法の開発

研究課題名(英文) Development of fluorescence detection analytical ultracentrifugation

研究代表者

内山 進 (Susumu, Uchiyama)

大阪大学・工学研究科 准教授

研究者番号：90335381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光超遠心沈降速度法を用いて、血清中における抗原と抗体の相互作用様式の決定を試みた。その結果、抗体の種類によって形成される複合体のサイズが異なり、各抗体の複合体サイズの形成傾向についてはインフリキシマブはアダリムマブやエタネルセプトよりも抗原と大きな複合体を形成することが分かった。一方、形成される免疫複合体の大きさとFc受容体を介した免疫細胞内における信号伝達の程度との関係性を評価した結果、蛍光超遠心分析法で確認された免疫複合体サイズの大きさと、Fc受容体を介した信号伝達との間には高い相関が観測され、特に大きな免疫複合体を形成する抗体では、強い信号伝達が観測された。

研究成果の概要(英文)：We characterized the binding stoichiometry and sizes of soluble TNF-antagonist complexes for adalimumab, infliximab, and etanercept that were formed in human serum. Fluorescence-detected sedimentation velocity analytical ultracentrifugation analyses revealed that adalimumab and infliximab formed a range of complexes with TNF, with the major complexes consisting of 3 molecules of the respective antagonist and one or 2 molecules of TNF. Considerably greater amounts of high-molecular-weight complexes were detected for infliximab in human serum. Etanercept exclusively formed 1:1 complexes with TNF in PBS, and a small amount of complexes with higher stoichiometry was detected in human serum. Consistent with these biophysical characterizations, a reporter assay showed that adalimumab and infliximab, but not etanercept, exerted FcγRIIIa- and FcγRIIIa-mediated cell signaling in the presence of TNF and that infliximab exhibited higher potency than adalimumab.

研究分野：生物物理化学

キーワード：抗体 複合体 蛋白質医薬 免疫原性 超遠心分析 質量分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛋白質は生体内で他の蛋白質や低分子などと相互作用し機能を発揮しているが、この相互作用は過渡的であり、常にダイナミックに離合集散を繰り返している。こうした相互作用解析は、申請者の研究を含め、専ら *in vitro* において希釈濃度でかつ特定の 1~2 種の蛋白質のみが存在する条件で行われてきたため、*in vitro* で得た相互作用情報は、患者に抗体を投与した際の *in vivo* での効果の参考情報程度に留まっており、抗体医薬の開発や効果的な治療の妨げとなっている。こうした乖離の一因は以下にある。実際の生体内では多種類の分子が高濃度で共存するため、希薄溶液とは溶液環境が大きく異なっており、相互作用様式が異なると指摘されている (Minton, *Curr. Biol.* 2006)。高濃度溶液では分子同士が混み合う効果により系のエネルギーが上昇し不安定化するが、蛋白質分子が他の分子と結合し体積を減らす、あるいはコンパクトになることで安定化させるクラウディング効果と呼ばれる現象が見られる。また、申請者は、分子が体積を持つことに由来する排除体積効果が高濃度溶液中での分子同士の反発に寄与することを報告している (Saito 他 *Pharm. Res.* 2013)。こうした事実は、生体内での蛋白質機能を真に理解し産業へと発展させるためには、生体内と同様の環境で反応に関わる複数種類の蛋白質間の相互作用を同時に評価する必要があることを示している。

(2) これまで、バイオ医薬品の一種である抗体医薬品の有効性や副作用発現を分子レベルで理解するため、抗原と抗体間の結合メカニズムに注目した研究が盛んに行われてきた。抗体医薬品が実際に投与されるのは血液中であるため、血液中での抗体医薬の振る舞いを知ることが重要である。ところが、血液は多くのタンパク質が存在する複雑な環境であるため、血液中での抗体や抗原の振る舞いを正確に調べることは難しく、実際の *in vivo* 環境での抗原-抗体結合様式には多くの不明点があった。

2. 研究の目的

Ex vivo において 3 種類の蛋白質について定量的相互作用を明らかとするため、蛍光超遠心沈降速度法 (FDS-AUC-SV、後述) を開発する。具体的には、リウマチなどの自己免疫疾患に関わる分子である TNF を標的とした抗体医薬であるヒト抗 TNF 抗体 (Adalimumab、Infliximab および Etnelcept) を対象に、血清中での抗原抗体複合体 (免疫複合体) の分散状態を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) FDS-AUC-SV の確立

まず、緩衝液中での相互作用解析 3 種類の抗体の蛍光ラベル化条件の最適化および FDS のセットアップを行った。蛍光色素 Alexa488

による修飾の最適化を行った。抗原抗体間の結合親和性をラベル化前後で吸光光学系を用いた沈降速度法 (ABS-AUC-SV) により測定し、数値が変化しないことを確認した。次に FDS を AUC にセットし、データ取得タイミング、フォーカス位置、等の調整を行い、FDS-AUC-SV と ABS-AUC-SV が同様の結果となる、測定条件を設定した。この段階では、希薄条件下、緩衝液中で測定を行い、測定手法の確立に最大限注力した。

(2) これまで ELISA や SPR により親和性を求めた例や、ある特定の濃度での解析例は報告されているが、抗原と抗体の濃度がそれぞれ変化した際の溶液中での化学量論は知られていない。そこで、TNF (抗原)、ヒト抗 TNF 抗体 (Adalimumab、Infliximab および Etnelcept) を準備し、3 次元マトリクス状に量比を変化させて各状態における複合体形成の化学量論を決定した。全ての蛋白質はカイコを用いた発現系を用いて調製した蛋白質を用いた。次に、密度と粘度について実際に用いた血清について実測により求め、ヒト抗 TNF 抗体に蛍光ラベルを施し、FDS-AUC-SV により血清中での分散状態を解析した。

(3) さらに、各抗体が抗原と形成する免疫複合体と FcR を介したシグナル伝達の関係について、FcR 発現組換え Jurkat 細胞を利用したルシフェラーゼアッセイにより測定を行った。

4. 研究成果

(1) 今回、FDS-AUC-SV により nM 領域での抗原と抗体の複数の濃度比における沈降パターンの数値解析から、抗原と抗体 (免疫複合体) の化学量論を正確に決定することが出来た。また、抗 TNF 抗体の Fab と TNF との解離定数を ITC から求め、その値を用いて抗原と抗体の各濃度比での免疫複合体のサイズ分布の変化をシミュレートすることに成功した (図 1)。

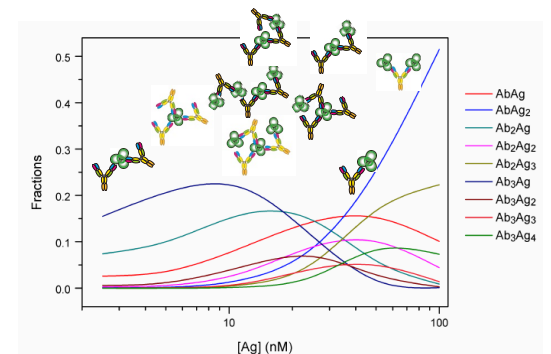


図 1 抗原濃度に対する免疫複合体のサイズ依存

この結果から、抗原と抗体の濃度比がある一定の範囲になった場合には 3 分子の抗体に 2 分子の抗原が結合した大きな免疫複合体が主成分を占めることが分かった。また、Infliximab は Adalimumab と比べると大きな抗原抗体複合体をリン酸緩衝液中で形成して

いることを確認した。また、Etarcelcept では大きな複合体は全く形成されず、1:1 の複合体のみが形成されていることが分かった。

(2) 更に、FDS-AUC-SV を用いて、同様の濃度域で血清中における抗原と抗体の相互作用様式の決定を試みた (図 2A)。その結果、リン酸緩衝液と同様に抗体の種類によって形成される複合体のサイズが異なっており、さらに、各抗体の複合体サイズの形成傾向もリン酸緩衝液中での傾向と同様であった (図 2B)。また、この研究過程で、血清中で抗体はアルブミンと弱く相互作用していることが確認され、この結果からアルブミンは血清中で抗体を安定化している可能性が示唆された。

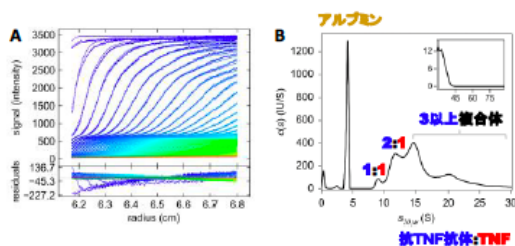


図 2 蛍光超遠心による免疫複合体の観測

(3) 最後に、形成される免疫複合体の大きさと Fc 受容体を介した免疫細胞内における信号伝達の程度との関係性を評価した結果、蛍光超遠心分析法で確認された免疫複合体サイズの大きさと、Fc 受容体を介した信号伝達との間には高い相関が観測され、特に大きな免疫複合体をリン酸緩衝液および血清中で形成する抗体では、強い信号伝達が観測された (図 3)。この結果は、免疫複合体の大きさが大きくなる抗体医薬の場合、Fc 受容体を介した好ましくない信号伝達が起こる可能性を示唆している。

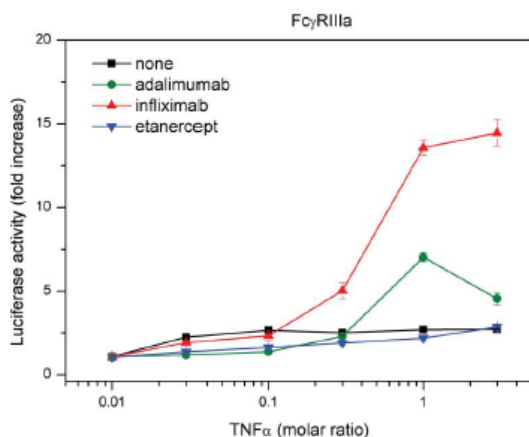


図 3 FcR 発現 Jurkat 細胞によるアッセイ

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Krayukhina, E., Noda, M., Ishii, K., Maruno, T., Wakabayashi, H., Tada, M., Suzuki, T., Ishii-Watabe, A., Kato, M., Uchiyama, S.

Analytical ultracentrifugation with fluorescence detection 1 system reveals differences in complex formation between recombinant human TNF α and different biological TNF α antagonists in various environments. *mAbs* **2017**, *9*, 664-679.

[学会発表] (計 4 件)

①内山 進、バイオ医薬品に含まれる凝集体の適切な分析に向けて、日本薬学会 137 年会 2017 年 3 月 27 日、仙台

②Susumu Uchiyama, Biophysical analytical methods for biotechnology, Taiwan Biophysics Conference, May 20, 2017, Kaoshun, Taiwan

③石井健太郎, 丸野孝浩, 岡本優太, 野田 勝紀, 内山 進, 「質量分析による抗体医薬と抗原の相互作用解析」、質量分析討論会、2017 年 5 月 19 日、筑波

④内山 進、「バイオ医薬品に含まれる凝集体の適切な分析に向けて」、日本薬学会 137 年会、2017 年 3 月 27 日、仙台

[図書] (計 3 件)

①Uchiyama, S., Arisaka, F. Important and essential theoretical aspects of AUC. Analytical Ultracentrifugation, Instrumentation, Software, and Applications, P3-14, Uchiyama, S., Arisaka, F., Stafford, W.F., Laue, T. (Eds.), Springer, 2016.

②Arisaka, F., Uchiyama, S. Experimental design and practical aspect. Analytical Ultracentrifugation, Instrumentation, Software, and Applications, P15-21, Uchiyama, S., Arisaka, F., Stafford, W.F., Laue, T. (Eds.), Springer, 2016.

③Saito, S., Uchiyama, S. Biopharmaceuticals - Evaluation of intermolecular interactions by AUC-SE-. Analytical Ultracentrifugation, Instrumentation, Software, and Applications, P419-440, Uchiyama, S., Arisaka, F., Stafford, W.F., Laue, T. (Eds.), Springer, 2016.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
内山 進 (UCHIYAMA, Susumu)
大阪大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：90335381

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()