

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06776

研究課題名(和文) 抗体医薬品の分子設計に起因するFcRn親和性の変化が動態等に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Influences of the change of FcRn affinity caused by antibody molecular design on pharmacokinetics.

研究代表者

鈴木 琢雄 (Suzuki, Takuo)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・主任研究官

研究者番号：10415466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬品は、新生児型Fc受容体(FcRn)と結合して分解から保護されることで、比較的長い血中半減期を持つことが知られている。FcRnはトランスサイトーシスや抗原提示細胞内の輸送にも関与するとされており、FcRn親和性の違いは抗体医薬品の動態や抗原提示に広範な影響を及ぼすと考えられる。本研究では、FcRn親和性を改変した抗体とヒトFcRnトランスジェニックマウスを用いて、未分解抗体と分解物を区別可能な分布解析法による解析を実施し、FcRn親和性が抗体医薬品の分布に及ぼす影響を明らかにした。さらに、抗原や抗薬物抗体との複合体形成の影響や抗薬物抗体の産生について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、FcRn親和性の違いが臓器分布に及ぼす影響について明らかにすることが出来た。得られた知見は、効果的な抗体医薬品類の分子設計や、FcRn親和性が従来と異なる抗体医薬品の有効性、安全性の評価において重要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic immunoglobulin G (IgG) antibodies have comparatively long half-lives because the neonatal Fc receptor (FcRn) binds to the IgG Fc at acidic pH in the endosome and protects IgG from degradation. Moreover, since FcRn is also considered to play important role in transcytosis of IgGs and trafficking of antigen-bearing IgGs in antigen-presenting cells, the biodistribution and the antigen presentation may be affected by FcRn affinity. In this study, the FcRn-affinity modulated IgGs (adalimumab variants) were injected to human FcRn transgenic mice, and the influence of the FcRn affinity on the biodistribution of IgG was elucidated using the method for distinguishing breakdown products from intact antibodies. Moreover, the production of anti-drug antibody and the biodistribution of the complex of the adalimumab variant with the antigen or anti-drug antibody was analyzed.

研究分野：バイオ医薬品の評価科学

キーワード：FcRn FcRn親和性改変抗体 分布 分解 体内動態 ヒトFcRnトランスジェニックマウス 抗薬物抗体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品は、その Fc 部分が血管内皮細胞等に存在する新生児型 Fc 受容体 (FcRn) と結合し、分解から保護されることで、比較的長い血中半減期を持つことが知られている。FcRn はトランスサイトーシスや抗原提示細胞内の輸送にも関与するとされており、FcRn 親和性の違いは抗体医薬品の動態や抗原提示に広範な影響を及ぼすと考えられるが、不明な点が多い。

抗体医薬品はがんや免疫疾患等の治療薬として非常に重要な役割を担うようになり、我が国においても 40 種以上の品目が承認に至っている。技術の進歩により、有効性上昇などを目的とした工夫を施された医薬品の開発が活発化しているが、FcRn 親和性改変抗体や抗体薬物複合体 (ADC) 等のように、FcRn 親和性が従来の抗体医薬品とは異なる、もしくは異なる可能性があるものも多い。今後の効果的な抗体医薬品類の分子設計につなげるため、また、これらの医薬品の有効性、安全性に関わる知見を得るために、FcRn 親和性の変化が動態等に及ぼす影響を解明することは急務である。

2. 研究の目的

近年、従来とは一線を画す分子設計をなされた抗体医薬品が開発されており、FcRn 親和性改変抗体や抗体薬物複合体 (ADC) 等のように、FcRn 親和性が従来の抗体医薬品とは異なる、もしくは異なる可能性があるものも多い。FcRn 親和性を改変した抗体とヒト FcRn トランスジェニックマウスを用いて、未分解抗体と分解物を区別可能な分布解析法 (mAbs 7, 759-769) 等による解析を実施し、FcRn 親和性が抗体医薬品の動態等に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

FcRn 親和性改変抗体の作製

抗 TNF- α 抗体医薬品であるアダリムマブの配列を基に構築した FcRn 親和性改変抗体発現ベクターを用い、CHO 細胞で発現、精製を行った。

FcRn 結合性の SPR 解析

FcRn をセンサーチップ上に固定化し、Biacore T-200 (GE healthcare) を用いて解析した。

- ・ FcRn を CM5 チップ (GE healthcare) にアミンカップリングで固定
- ・ running buf. : 50 mM Sodium phosphate, 150 mM NaCl (pH6 もしくは pH7.4)
- ・ 流速 30 μ l/min
- ・ 再生 : 100 mM Tris, 200 mM NaCl (pH8 もしくは pH9) 3 分
- ・ 平衡値解析で K_D を算出

分布解析

FcRn 親和性改変アダリムマブに蛍光色素 XeoLight680 と XenoLight750 (Caliper) を各約 2 分子ずつ結合させた標識アダリムマブ改変体を作製した。FcRn トランスジェニックマウス B6.Cg-Fcgrt^{m1Dcr}Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ (Jackson 研究所) を繁殖させ、週齢 5-6 週齢程度、体重 20g 程度の雌に標識アダリムマブ改変体を投与した。投与後 1 日もしくは 3 日後に臓器を摘出し、PBS を加えてホモジナイズした後、IVIS lumina II (Caliper) を用いて各種励起・蛍光波長で蛍光を測定し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理を用いて未分解抗体と分解物を分離した (mAbs 7, 759-769 参照)。

抗薬物抗体の解析

FcRn トランスジェニックマウス B6.Cg-Fcgrt^{m1Dcr}Tg(FCGRT)32Dcr/DcrJ にアダリムマブ改変体を投与し、経時的に血液を採取した。血漿を調製し、抗薬物抗体を SPR を用いた酸解離法で解析した。

4. 研究成果

FcRn 親和性改変抗体のアミノ酸置換部位を図 1 に示す。アダリムマブの配列を基に、FcRn 親和性を上昇させるアミノ酸置換を行った抗体 6 種類 (IH, LS, N434H, QA, QL, YTE) と、FcRn に結合しないアミノ酸置換を行った抗体 1 種類 (LOW) を実験に使用した。これらの抗体と、分布解析用に二重蛍光標識を行った抗体の酸性 (pH6) での FcRn 親和性を図 2 に示す。アダリムマブと比較し、改変体 (LOW を除く) は FcRn 親和性が上昇していることが確認された。蛍光標識により、FcRn 親和性は全体的に低くなるものの、相対的な K_D 値は非標識の改変体と大きく変わらず、FcRn 親和性の異なる標識抗体が準備できた。

Abbreviation	substitution (EU numbering)	substitution (adalimumab)	Example of substituted antibodies
IH	P257I N434H	P261I N438H	
LS	M428L N434S	M432L N438S	Rezilumab (approved)
N434H	N434H	N438H	MTRX1011A
QA	T307Q N434A	T311Q N439A	
QL	T256Q M428L	T254Q M432L	
YTE	M252Y S254T T256E	M256Y S258T T260E	MEDI-8897; MEDI4893; GSK2800528
LOW	I253A H310A H435A	I257A H314A H439A	

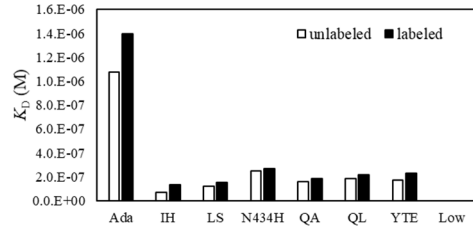
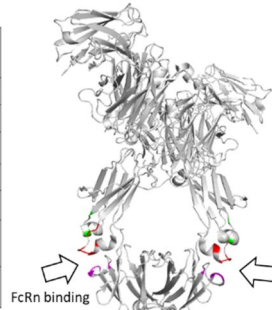


図2 アダリムマブ改変体と標識アダリムマブ改変体の FcRn 親和性



図1 FcRn 親和性改変抗体のアミノ酸置換部位 (mAbs, 13, e1923366 より改変)

なお、非標識の改変体については中性 (pH7.4) での FcRn への結合も測定しており、IH は pH7.4 で FcRn に結合したが、それ以外の改変体では結合は認められなかった。また、YTE については pH7 で FcRn と結合することが報告されている。

標識アダリムマブと、標識アダリムマブを proteinase K で切断した分解物を混合し、IVIS で解析した結果を図 3A、B に示す。標識アダリムマブとその分解物を混合比を変化させて 96 ウェルプレートに入れ、各種励起・蛍光波長で撮像した後、spectral unmixing により蛍光の分離を行った。混合割合に従って、シグナルが変化することが確認された。標識アダリムマブ改変体に関しても同様の結果であった。また、臓器の homogenate に、標識体もしくはその分解物を濃度を変化させて添加し、解析を行った。図 3C、D に肝臓の homogenate に標識アダリムマブと分解物を添加した結果の例を示す。添加量に従ってシグナルが変化し、標識体と分解物の分離も良好であった。また、添加後に室温で放置した場合や、添加後にさらに homogenize を行った場合でもシグナルの大きな変化は認められず、臓器に蓄積した抗体と分解物の量を適切に解析可能であると考えられた。

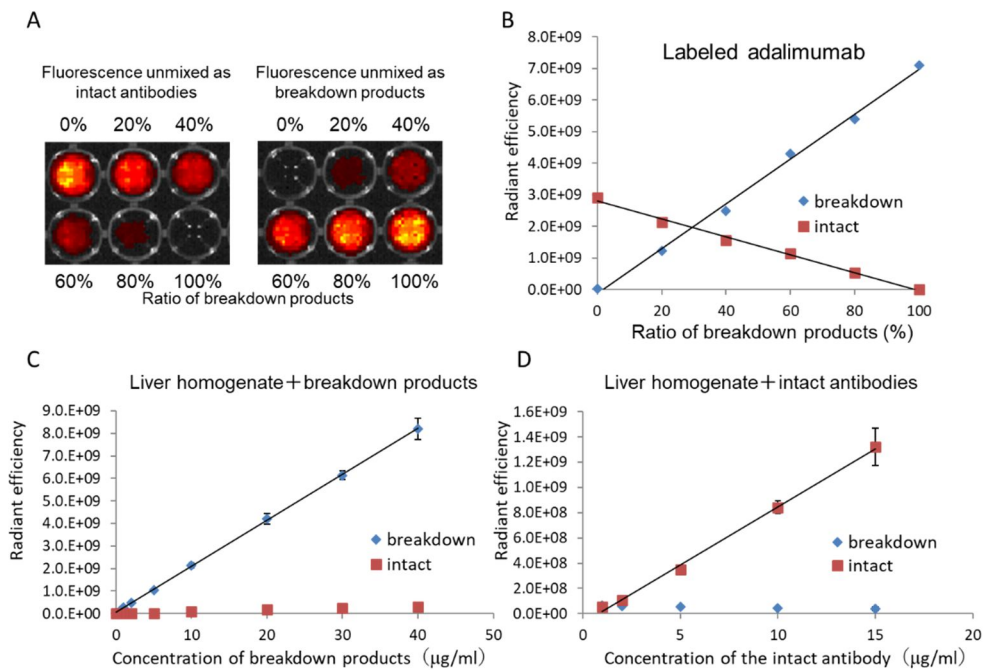


図3 標識抗体と分解物の分離解析

(A) 標識アダリムマブと分解物 (proteinase K 処理) 混合物の spectral unmixing 解析像、(B) 混合割合と(A)のシグナルのグラフ、(C) 肝臓 homogenate に標識アダリムマブ分解物を添加した場合のシグナル、(D) 肝臓 homogenate に標識アダリムマブを添加した場合のシグナル

ヒト FcRn トランスジェニックマウスに蛍光標識抗体を投与し、臓器への蓄積量の比較を行った。また、アダリムマブと同じく TNF- α を標的とし、アダリムマブよりも FcRn 親和性が低い Fc 融合タンパク質であるエタネルセプトについても同様に解析した。結果の一部として、投与後 1 日目の肝臓への蓄積の比較を図 4 に示す。

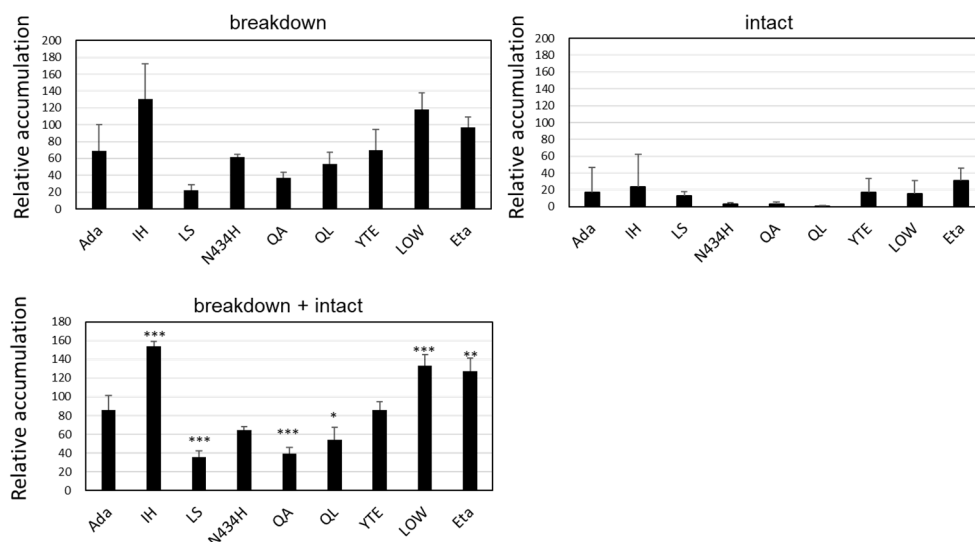


図 4 投与後 1 日の肝臓への蓄積比較

同濃度の標識抗体とその分解物のシグナル強度より、相対蓄積量を計算した (n=3)。Ada, adalimumab. Eta, etanercept. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs adalimumab, according to Dunnett's test.

分解の程度には個体差があり、分解物と標識抗体 (未分解物) の量はばらつきが大きい。肝臓に蓄積した抗体の多くは分解されていることが明らかとなった。また、分解物と未分解物の総量を比較すると、IH と YTE を除いて、FcRn 親和性の高い抗体はアダリムマブと比較して蓄積量が少ない傾向があり、FcRn 親和性の低い LOW やエタネルセプトは蓄積量が多かった。IH と YTE は中性での FcRn 結合性が高いことが、蓄積量の増加につながっていると考えられた。その他の臓器についても同様に解析を行ったところ、改変抗体種によって臓器への蓄積量が異なると共に、分解の程度も異なることが明らかとなった。

さらに、アダリムマブ及び一部のアダリムマブ改変抗体を用いて、抗原である TNF- α や抗薬物抗体と複合体を形成することによる分布への影響について解析を行ったところ、複合体形成により臓器への蓄積量が変化し、改変体の種類や、複合体形成に用いる抗原や抗薬物抗体の種類によって影響の強さが異なることが明らかになった。その他に、非標識の改変抗体をヒト FcRn トランスジェニックマウスに投与し、抗薬物抗体の産生に関する検討も行ったが、マウスの個体差が大きかったため、FcRn 親和性の違いが抗薬物抗体の産生に及ぼす影響に関しては、今後異なる手法を用いて検討を行うこととした。

本研究により、FcRn 親和性の違いが臓器分布に及ぼす影響について明らかにすることが出来た。得られた知見は、効果的な抗体医薬品類の分子設計や、FcRn 親和性が従来と異なる抗体医薬品の有効性、安全性の評価において重要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takuo Suzuki, Noritaka Hashii, Minoru Tada and Akiko Ishii-Watabe	4. 巻 13
2. 論文標題 The influence of antibody engineering on Fc conformation and Fc receptor binding properties: Analysis of FcRn-binding engineered antibodies and an Fc fusion protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mAbs	6. 最初と最後の頁 e1923366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19420862.2021.1923366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木琢雄、橋井則貴、多田 稔、石井明子
2. 発表標題 FcRn親和性改変抗体等のFc 受容体結合性や高次構造に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2018年～2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 鈴木琢雄、石井明子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社じほう	5. 総ページ数 15
3. 書名 バイオ医薬品の品質管理戦略 第2版、第7章-1 薬物動態と品質特性	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------