

機関番号：82601
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590167
 研究課題名（和文） Fc 受容体との相互作用に着目した TNF 阻害抗体医薬の生物学的特性に関する研究
 研究課題名（英文） Fc receptor-related biological properties of anti-TNF therapeutics

研究代表者
 石井 明子（ISHII AKIKO）
 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 第二室長
 研究者番号：50291117

研究成果の概要（和文）：

臨床応用されている各種 TNF 阻害薬の生物活性の差異を明らかにすることを目的に、抗 TNF 抗体医薬品（インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ）及び TNF 受容体-Fc 融合タンパク質医薬品（エタネルセプト）について、1)血中半減期制御に関わる受容体 FcRn との結合親和性、2)TNF との複合体形成能及び複合体の Fc γ R 活性化能を解析した。その結果、1)Fc 融合タンパク質の FcRn 結合親和性が抗体と比較して低いこと、2)TNF との複合体形成能が 3 種類の抗体で異なり、形成される複合体サイズが Fc γ R 活性能に影響することが明らかになった。Fc 受容体との相互作用に関するこれらの違いが、ヒトでの血中半減期や、免疫エフェクター細胞の活性化を介したインフュージョン反応あるいは抗薬物抗体の発現頻度等に影響している可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate the differences in the biological activities of anti-TNF therapeutics, their interactions with Fc receptors were examined. TNFR-Fc fusion protein showed lower affinity to FcRn than the anti-TNF antibodies did. Apparent molecular size of the complexes composed of TNF and anti-TNF antibodies differed in each antibody, and the activation of Fc γ R was dependent on the complex size. These characteristics were thought to be responsible for the differences in their serum half-life regulated by FcRn, and the incidence of infusion reaction or anti-drug antibody, which is related to the activation of Fc γ R on immune effector cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|------|-----------|
| 2008 年度 | 1,500,000 | 0 | 1,500,000 |
| 2009 年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 総計 | 3,700,000 | 0 | 3,700,000 |

研究分野：生物薬品学、医薬品評価科学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：抗体医薬品、Fc 融合タンパク質医薬品、Fc 受容体、FcRn、Fc γ R、TNF

1. 研究開始当初の背景

バイオ医薬品あるいは生物学的製剤とも称される TNF 阻害薬は、その主な適用疾患である関節リウマチの治療において、従来のステロイドや疾患修飾性抗リウマチ薬によ

る治療では得られなかった優れた治療効果を発揮し、“The era of biological therapy has arrived.”と言われるほどに、治療のストラテジーを大きく変えた (Isenberg AD.: Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2, 229, 2006)。

本研究の開始当初、日米欧で3種類（キメラ型抗TNF抗体：インフリキシマブ、ヒト抗TNF抗体：アダリムマブ、TNFR-Fc融合タンパク質：エタネルセプト）のTNF阻害薬が承認されていた。これらはいずれもTNFへの特異的結合能を有し、ヒトIgG1由来のFc領域を持つ組換えタンパク質である。それぞれ治療薬としての有効性は実証されているが、類似した性質を持つこれらの医薬品をどのように使い分けるかが臨床での新たな課題となっていた（三村俊英：日本臨床，65，1282，2007）。その後、欧米ではヒト抗TNF抗体：ゴリムマブ、PEG修飾ヒト抗TNF抗体Fab：セルトリズマブ ペゴルが承認され、現在では計5種類のTNF阻害薬が臨床で用いられている。（本報告書では、抗TNF抗体医薬品及びTNFR-Fc融合タンパク質をTNF阻害薬と総称する。）

2. 研究の目的

本研究では、各TNF阻害薬の差異解明に向けた薬学的見地からのアプローチの一つとして、Pharmacokinetics / Pharmacodynamics (PK/PD) を考える上で重要な情報となるFc受容体との相互作用特性に着目し、その差異を明らかにすることを目的とする。Fc受容体としては、IgGの血中濃度や生体内分布制御に関わるFcRn、及び、IgGによるエフェクター細胞活性化に関与するFcγR各サブクラスを評価対象とする。

3. 研究の方法

(1) 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法によるTNF阻害薬とFc受容体の結合親和性測定

FcRnとの結合性親和性は、FcRnをリガンド、TNF阻害薬をアナライトとして測定した。FcRn細胞外領域をセンサーチップCM5 (BIAcore)にアミンカップリングキット (BIAcore)を使用して固定化した。Running緩衝液として50 mM sodium phosphate / 150 mM NaCl (pH6.0)を用い、流速20 μl/分でTNF阻害薬をインジェクションした (KINJECT、結合120秒、解離150秒)。再生用緩衝液は100 mM Tris / 200 mM NaCl (pH8.0)とし、4分間送液した。得られたセンサーグラムは、bivalent analyte modelで解析した。

FcγRとの結合親和性は、TNF阻害薬をリガンド、FcγRをアナライトとして測定した。TNF阻害薬をセンサーチップCM5にアミンカップリングキットを用いて固定化した。Running緩衝液としてHBS-EP (BIAcore)を用い、流速20 μl/分でFcγRI、FcγRII、FcγRIIIの細胞外ドメインとHis-tagの融合タンパク質 (R&D System) をインジェクションした

(KINJECT 流速20 μl/分、容量40 μl、結合120秒、解離150秒)。再生用緩衝液は10 mM Glycine-HCl (pH8.0)とし、15秒間送液した。得られたセンサーグラムは、1:1 binding modelで解析した。

(2) 抗TNF抗体医薬品の複合体形成能の差異解析

①複合体分子サイズの測定

抗TNF抗体医薬品であるアダリムマブ、インフリキシマブ、ゴリムマブを大腸菌を用いて発現・精製したTNFαとそれぞれ混合し、形成される複合体サイズを動的光散乱法により測定した。測定された平均粒子径から抗原抗体複合体の推定分子量を算出した。

②FcγR親和性の測定

FcγRIIaを安定発現するJurkat細胞 (Jurkat/FcγRIIa) に対してDyLight488標識した抗TNF抗体医薬品を結合させ、フローサイトメーターを用いて平均蛍光強度を測定し、結合量の指標とした。添加した抗体濃度に対して平均蛍光強度をプロットし、非線形回帰により見かけ上の親和性 (K_D 値) を算出した。TNF/TNF抗体複合体については混合比率 (モル比) を変えた際の結合量を同様の手法で測定した。

③TNF/抗TNF抗体医薬品複合体によるFcγR活性化能の評価

抗TNF抗体医薬品を各濃度のTNFαと混合して複合体を形成させた後、Jurkat / FcγRIIa細胞に添加し、phorbol 12-myristate 13-acetate存在下で18時間培養した。培養上清に分泌されたIL-2量をELISAにより測定し、FcγR活性化の指標とした。

4. 研究成果

(1) SPR法を用いたFc受容体とTNF阻害薬の結合特性の解析

FcRnとエタネルセプト、アダリムマブ、インフリキシマブとの結合・解離を測定したSPRセンサーグラムを図1A-Cに示す。カラーで示したラインが観測されたセンサーグラムであり、黒のラインがbivalent analyte modelで解析したフィッティングカーブである。アナライト濃度は非特異的結合の認められない濃度範囲を使用し、抗体に関しては670-42 nMとした。Fc融合タンパク質であるエタネルセプトは抗体と同濃度では結合量が少なく解析に適していなかったため5360-168 nMとした。

これらのセンサーグラムから計算された K_D 値はエタネルセプト 3612 nM、アダリムマブ 672 nM、インフリキシマブ 727 nM であ

あった(図1D)。ヒトでは、エタネルセプトの血中半減期がアダリムマブ及びインフリキシマブと比較して短いことが知られている。本実験の結果から、その差異の原因の一つにFcRn結合親和性があると考えられた。また、IgGでは、CH2-CH3間付近がFcRn結合部位とされているため、Fc融合タンパク質と抗体医薬品では、この領域の高次構造が異なっていると考えられた。

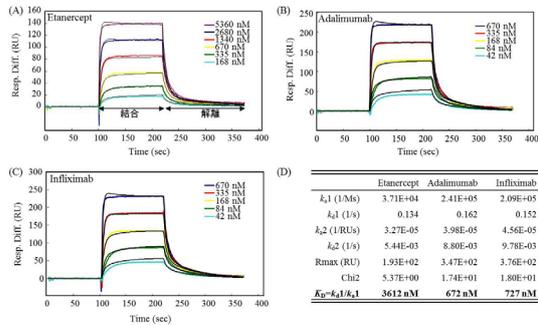


図1 TNF阻害薬とFcRnの結合に関するSPR解析結果

次にFcγRとTNF阻害薬の親和性について検討した。SPR法によりFcγRとTNF阻害薬の結合を解析する場合、再生段階でpHを1.8にする必要があり、受容体の変性が問題となったため、TNF阻害薬をリガンド、FcγRをアナライトとした。本条件ではFcγRII、FcγRIIIの結合が弱く解析不能であったため、FcγRIとの親和性のみ図2に示す。エタネルセプト、アダリムマブ、インフリキシマブとFcγRIの親和性は同程度の値となった。IgGでは、ヒンジ領域付近がFcγRI結合部位とされているため、この領域の高次構造は、Fc融合タンパク質と抗体医薬品で大きな差はないと考えられた。

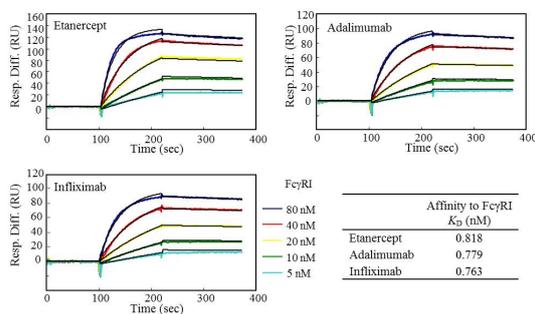


図2 TNF阻害薬とFcγRIの結合に関するSPR解析結果

エタネルセプト、アダリムマブ、インフリキシマブはいずれもヒトIgG1由来のFcドメインを有しているものの、アロタイプの間違

により、Fcドメインの2箇所のアミノ酸残基が異なっている(図3)。また、産生細胞の違いにより、Fc領域に結合している糖鎖構造がそれぞれ異なっている可能性がある。

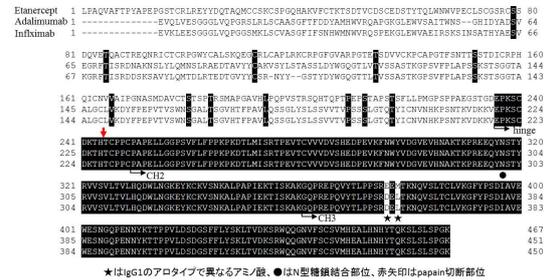
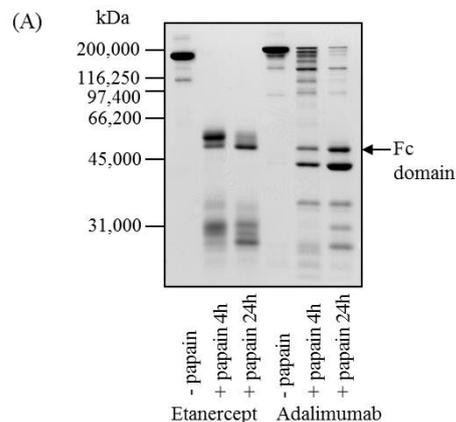


図3 TNF阻害薬(エタネルセプト、アダリムマブ、インフリキシマブ)のアミノ酸配列

そこで、アロタイプの違いや、糖鎖等の翻訳後修飾がFcRnとの親和性に影響を及ぼしている可能性を検証するため、パパイン消化によりFc領域を分離して、FcRnとの親和性を解析した。パパインと24時間反応させることによりFc領域の分離が可能であり(図4A)、切断により、アダリムマブとエタネルセプトのセンサーグラムが同様の形状へと変化することが明らかになった(図4B)。

K_D 値を算出したところ、パパイン消化前には抗体医薬品と比較して低かったエタネルセプトのFcRn結合親和性が、パパイン消化後は抗体医薬品に匹敵する程度に上昇することが明らかとなった(図4C)。したがって、これら医薬品のFcRn結合親和性の差異は、Fc部分のアミノ酸配列や糖鎖構造の相違によるものではなく、Fabあるいは受容体部分の影響により生じるFc領域の高次構造環境の違いに起因することが示唆された。このような違いを生じさせる原因としては、Fc融合タンパク質と抗体ではFc領域の高次構造が異なること、あるいは、Fc融合タンパク質では受容体部分が立体的に障害となり、FcRn結合親和性が低下していることが考えられる(図4D)。



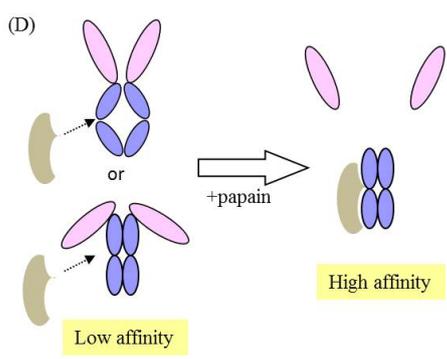
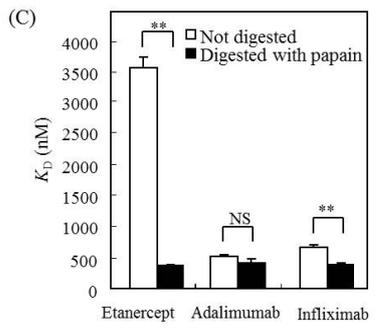
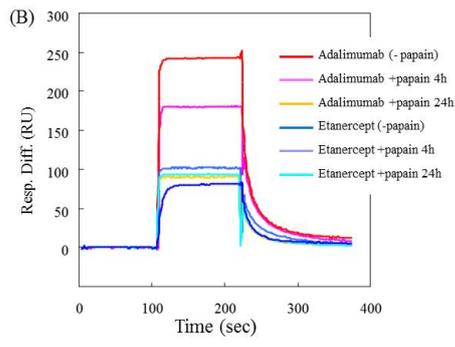


図 4 パパイン消化による TNF 阻害薬の FcRn 結合親和性の変化

Fc領域以外の構造が FcRn との親和性に影響を与えるということが明らかとなったため、TNF 阻害薬が TNFα と結合した場合の親和性の変化についても検討を行った。TNFα は 3 量体であり、抗体や融合タンパク質に対して十分量存在しないと、TNFα と抗体（融合タンパク質）が架橋されヘテロな大きさの多量体を形成すると考えられる。抗体に対して 8 倍モル濃度、エタネルセプトに対して 4 倍モル濃度の TNFα を反応させ、TNFα による架橋を抑えた条件で FcRn との親和性を測定した(図 5)。

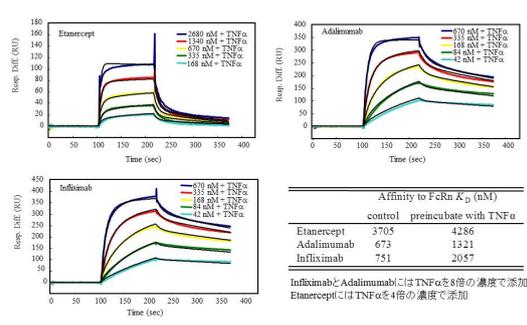


図 5 TNF との複合体形成による TNF 阻害薬の FcRn 結合親和性の変化

この結果、TNFα との結合により、センサーグラムの形状や算出される K_d 値が変化した。これより、抗原結合によっても Fc 領域の構造変化が引き起こされると考えられた。エタネルセプト、アダリムマブ、インフリキシマブの中ではインフリキシマブの K_d 値の変化が大きく、抗原結合による影響を受けやすい可能性が示された。例えば、体内の抗原量が多い患者ではインフリキシマブの血中半減期が短い可能性も考えられる。

以上の結果は、既承認 TNF 阻害薬について、血中濃度の制御に関わる FcRn との結合親和性の差異、及びそれを規定する構造特性差異を見出した初めての知見である。

(2) 抗 TNF 抗体医薬品の複合体形成能の差異解析

アダリムマブ、インフリキシマブ、ゴリムマブと TNFα を混合し、形成された複合体の粒子径を光散乱法により測定した結果、TNFα 添加量の増加に伴い複合体形成による分子サイズの増大が認められた(図 6)。形成される複合体のサイズはインフリキシマブ > ゴリムマブ > アダリムマブの順に大きく、特にインフリキシマブでは、より低濃度の TNFα 存在下で高分子量の複合体の形成が認められた。このような複合体形成能はこれら抗体医薬品と TNFα との結合親和性(ゴリムマブ > インフリキシマブ > アダリムマブ)とは相関しておらず、エピトープの違いなど他の要因によるものである可能性が考えられた。

複合体形成能の差異が生物学的特性に及ぼす影響を調べる目的で、免疫細胞に発現する FcγR との相互作用に関する検討を行った。FcγRIIa を安定発現する Jurkat 細胞 (Jurkat/FcγRIIa) を用いて、TNFα 非存在下で抗体医薬品単独の結合親和性を測定し

た結果、アダリムマブ、インフリキシマブ、ゴリムマブは何れも同程度 (数十 nM) の K_D 値を示し顕著な差は認められなかった (データ未掲載)。

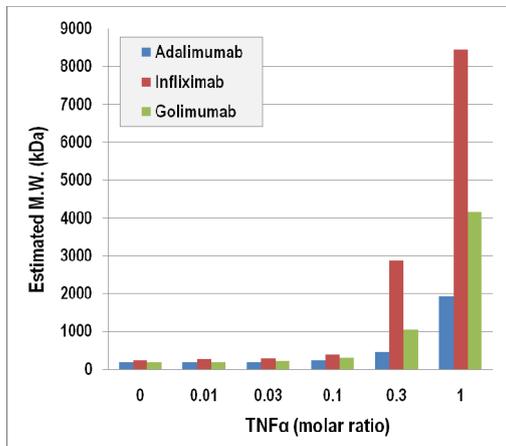


図6 動的光散乱法による TNF/抗 TNF 抗体医薬品複合体サイズの検討

続いて TNF α と複合体を形成させた際の結合親和性について検討した結果、何れの TNF 阻害薬においても添加する TNF α 量の増加に伴って Fc γ R に対する結合量の増大が認められ、3 者の中で顕著な差は認められなかった (図 7)。これらの結果から、TNF α との複合体形成能の差異は Fc γ R との結合親和性には影響を及ぼさないことが示唆された。

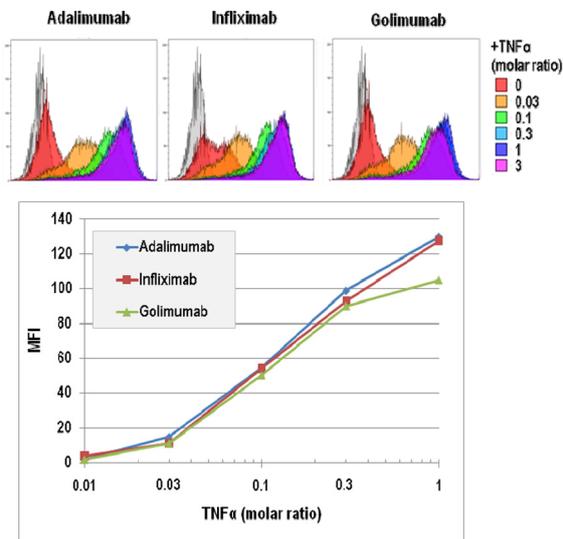


図7 Jurkat/Fc γ RIIa 細胞に対する TNF/抗 TNF 抗体医薬品複合体の結合実験

次に複合体形成能の差異が免疫エフェクター細胞の活性化に關与する可能性を検討する目的で、Jurkat/Fc γ RIIa 細胞に TNF α

との混合比率を変えた複合体を添加し、Fc γ R の活性化に伴って培養上清に分泌される IL-2 量を測定した。

ネガティブコントロールとして用いた TNFR-Fc 融合タンパク質エタネルセプトでは IL-2 産生は認められなかったのに対し、3 種類の抗体医薬品では TNF α 添加量に依存して IL-2 産生の亢進が観察された (図 8)。IL-2 産生量の差から Fc γ R 活性化能はインフリキシマブ > ゴリムマブ > アダリムマブの順に強いと考えられ、上述の複合体形成能と相関を示した。これらの実験結果は、抗 TNF 抗体医薬品の抗原-抗体複合体の形成様式およびそれに伴う複合体形成能の差異が、Fc γ R を介した免疫エフェクター細胞の活性化能に關与する可能性を示唆している。

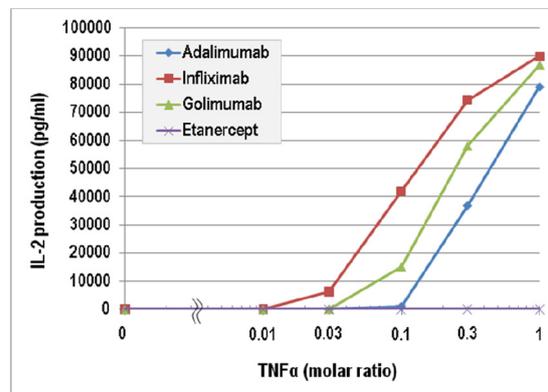


図8 TNF/抗 TNF 抗体医薬品複合体による Jurkat/Fc γ RIIa 細胞の活性化

抗体は抗原と複合体を形成することでマクロファージ等に貪食されて血中から消失することが知られており、実際にいくつかの抗体医薬品では可溶性抗原の存在下では血中半減期が短縮するという報告がある。インフリキシマブが TNF α とより低濃度で大きな複合体を形成しやすく、マクロファージ等に発現する Fc γ R を活性化しやすいという今回の実験結果は、インフリキシマブが アダリムマブ、ゴリムマブに比べて血中半減期が短いことを説明する一つの理由である可能性が考えられる。また、インフリキシマブはインフュージョン反応や抗薬物抗体産生の発生率が高いことが知られているが、これらに關しても免疫エフェクター細胞上の Fc γ R の活性化能の強さに起因する可能性が考えられる。

以上の結果は、抗原との複合体形成能 (複合体サイズ) の差異が抗 TNF 抗体医薬品の有効性や安全性に關与する可能性を示した初めての知見である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Suzuki T, Ishii-Watabe A, Tada M, Kobayashi T, Kanayasu-Toyoda T, Kawanishi T, Yamaguchi T: Importance of FcRn in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1. A comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human FcRn. *J.Immunol.*, 184(4), 1968-1976 (2010)
- ② Ishii-Watabe A, Saito Y, Suzuki T, Tada M, Ukaji M, Maekawa K, Kurose K, Kaniwa N, Sawada J, Kawasaki N, Yamaguchi T, Nakajima TE, Kato K, Yamada Y, Shimada Y, Yoshida T, Ura T, Saito M, Muro K, Doi T, Fuse N, Yoshino T, Ohtsu A, Saijo N, Hamaguchi T, Okuda H, Matsumura Y: Genetic polymorphisms of FCGRT encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 25(6), 578-587 (2010)
- ③ 石井明子, 鈴木琢雄, 多田 稔, 川西 徹, 山口照英, 川崎ナナ: 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn *日本薬理学会誌* 136(5), 280-4 (2010)

[学会発表] (計7件)

- ① 多田 稔, 石井明子, 鈴木琢雄, 豊田淑江, 川崎ナナ: 複合体形成能に着目した抗 TNF α 抗体医薬品の生物活性評価に関する研究 *日本薬学会第131年会* 2011年3月
- ② 多田 稔, 石井明子, 鈴木琢雄, 斎藤嘉朗, 川崎ナナ: FCGRT 遺伝子多型解析により見出された Neonatal Fc receptor (FcRn) 変異体の機能解析 *BMB2010* 2010年12月
- ③ 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 小林 哲, 豊田淑江, 川西 徹, 山口照英: 抗体 医薬品と Fc ドメイン融合タンパク質医薬品における胎児性 Fc 受容体 (FcRn) 親和性の差異に関する検討 *日本薬学会第130年会* 2010年3月
- ④ 宇梶真帆, 斎藤嘉朗, 前川京子, 黒瀬光一, 鹿庭なほ子, 石井明子, 山口照英, 澤田純一, 長谷川隆一, 奥田晴宏, 加藤健, 濱口哲弥, 山田康秀, 島田安博, 吉野孝之, 大津敦, 松村保広, 西條長宏, 宇良敬, 室圭 neonatal Fc receptor (FcRn) をコードする FCGRT 遺伝子の日本人における多型探索 *日本薬学会第130年会* 2010年3月

- ⑤ 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 小林 哲, 豊田淑江, 川西 徹, 山口照英: 抗体医薬品および Fc ドメイン融合タンパク質医薬品の Fc 受容体 (FcRn および Fc γ RI) との結合特性比較 *第82回日本生化学会大会* 2009年10月
- ⑥ 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 小林 哲, 豊田淑江, 川西 徹, 山口照英: 抗体医薬品および Fc ドメイン融合タンパク質医薬品の Fc 受容体 FcRn との結合親和性比較 *日本薬学会第129年会* 2009年3月
- ⑦ 鈴木琢雄, 石井明子, 小林 哲, 豊田淑江, 多田 稔, 川西 徹, 山口照英: 抗体医薬品および Fc ドメイン融合タンパク質医薬品と Fc 受容体 FcRn の相互作用特性解析 *日本薬物動態学会 第23回年会* 2008年10月

[図書] (計1件)

鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子: 先端バイオ医薬品の評価技術 第9章「バイオ医薬品の特性解析」3. 生物学的性質解析 株式会社シーエムシー出版, 東京, pp. 197-211 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 明子 (ISHII AKIKO)
国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・第2室 室長
研究者番号: 50291117

(2) 研究分担者

鈴木 琢雄 (SUZUKI TAKUO)
国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・第2室 主任研究官
研究者番号: 10415466

多田 稔 (TADA MINORU)
国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・第2室 研究員
研究者番号: 50506954