

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06705

研究課題名（和文）MAPPs解析によるFcRn親和性の変化が抗原提示に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）MAPPs assay to elucidate the influences of the change of FcRn affinity on the antigen presentation.

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。血中半減期のさらなる延長を目指し、通常の抗体よりもFcRn親和性を上昇させたアミノ酸改変抗体が開発され、近年数品目が承認されている。一方で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、抗体医薬品の体内分布や抗原提示にも広範な影響を及ぼす可能性がある。本研究では、MHC-Associated Peptide Proteomics（MAPPs）の手法を用いてFcRn親和性改変抗体の抗原提示について分析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年FcRn親和性の異なる抗体医薬品が承認されてきているものの、FcRn親和性改変抗体の抗原提示については、不明な点が多い。本研究はMHC-Associated Peptide Proteomicsの手法を用いてFcRn親和性改変抗体の抗原提示を分析する研究であり、これまでの研究を大きく推進させ、新たな知見が得られることが期待される。本研究により得られる成果は、今後の効果的な抗体医薬品類の分子設計につながると共に、FcRn親和性の異なる医薬品の有効性、安全性に関する知見として非常に重要な意味を持つ。

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. To prolong the half-lives of therapeutic IgG antibodies and thereby reduce the required dose and frequency, amino acid-substituted antibodies having high affinity to FcRn are being developed and some antibodies have been approved. On the other hand, 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 antigen presentation of FcRn-binding engineered antibodies was analyzed using MHC-associated peptide proteomics (MAPPs) assay.

研究分野：バイオ医薬品評価科学

キーワード：FcRn 抗体医薬品 抗原提示 MAPPs

## 様式 C-19、F-19-1 (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、分解から保護されて血中にリサイクリングされることで、比較的長い血中半減期を持つことが知られている。そのため、血中半減期のさらなる延長を目指し、通常の抗体よりも FcRn 親和性を上昇させたアミノ酸改変抗体が開発され、数品目が承認されている。2019 年には、補体 C5 に対する抗体であるラブリズマブが発作性夜間ヘモグロビン尿症の治療薬として承認された。ラブリズマブは血中半減期が 50 日程度と、通常の抗体医薬品の 3-4 倍程度であり、2 回目以降の投与間隔が 8 週と、大幅に投与間隔を延長することに成功している。なお、研究開始時には承認されていなかったが、その後抗 SARS-CoV-2 抗体や抗 RSV 抗体等が承認されており、長い血中半減期が達成されている。

一方で FcRn はリサイクリングだけでなく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 (図 1) 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可能性があるが、不明な点が多い。申請者らはこれまでに FcRn 親和性改変抗体の体内分布解析などを実施してきており、本研究では FcRn 親和性改変抗体の抗原提示に関する解析を行う。

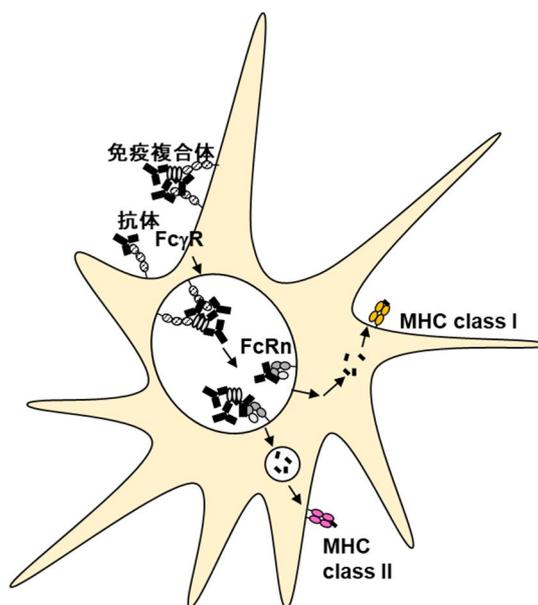


図 1 FcRn の抗原提示細胞内の輸送への関与

### 2. 研究の目的

FcRn 親和性改変抗体の開発が進んでいるが、その抗原提示への影響には不明な点があるため、MAPPs 解析により FcRn 親和性の改変が抗原提示に及ぼす影響を解明することが目的である。抗体と薬物を結合した抗体薬物複合体 (ADC) や Fc 融合タンパク質医薬品において、意図せずに FcRn 親和性が低下する可能性もあることより、FcRn 親和性と抗原提示の関係について明らかにすることは重要な意味を持つ。

### 3. 研究の方法

#### FcRn 親和性改変抗体の作製

抗 TNF- $\alpha$  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-biotin (Immunitrack もしくは Acro biosystems 社) をセンサーチップ上にキャプチャーし、Biacore T-200 (GE healthcare 社) を用いて解析した。

- ・ FcRn-biotin を Biotin capture kit (GE healthcare 社) を用いてチップにキャプチャー
- ・ running buf. : 50 mM Sodium phosphate, 150 mM NaCl (pH6)
- ・ 流速 30  $\mu$ l/min
- ・ 再生 : 100 mM Tris, 200 mM NaCl (pH8) 3 分
- ・ 平衡値解析で  $K_D$  を算出

#### 免疫沈降用ビーズの作製

FG beads (NHS beads, TAMAGAWA SEIKI) に MHC class II 抗体 (BD 社または Bioxcell 社の Mouse anti-human HLA-DR antibody) もしくは MHC class I 抗体 (Mouse anti-human MHC class I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) antibody) をアミンカップリングにより固定化した。エタノールアミンにより反応していない NHS 基をマスキングし、洗浄後 4 週で保管した。

#### MAPPs 試料作製

ヒト正常樹状細胞 (NHDC) (LONZA 社) を製品添付文書の通りに解凍、培養し、3 日後に被験物質トリポリリサッカライドで処理した。処理後 24 時間後に細胞を回収し、PBS で洗浄後、-80 で使用まで保管した。細胞を溶解して遠心後、上清を 20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 150 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol, cOmplete protease inhibitor cocktail tablets (Roshe 社) で希釈し、MHC class II 抗体を結合した FG

beads と 4 で一晩反応させた。反応させた beads を磁気分離により洗浄後、0.1% trifluoroacetic acid を加え、37 °C, 5 min 溶出した。一方で MHC class II 抗体と反応しなかった画分は MHC class I 抗体を結合した FG beads と 4 で一晩反応させた。反応後の beads は MHC class II の場合と同様に洗浄と溶出を行った。溶出されたペプチドはスピードバックを用いて乾燥させ、測定まで -20 °C で保管した。

#### MAPPs 解析

溶出されたペプチドを 0.1%ギ酸で溶解し、質量分析を行った( Thermo fisher 社、Orbitrap Fusion Lumos を使用 )。取得されたデータは PEAKS studio (Bioinformatics solutions 社) を用いて解析を行った。また、ペプチドの MS クロマトグラムの解析については Xcalibur (Thermo fisher 社)を用いた。

#### 4 . 研究成果

主に adalimumab と adalimumab 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改変体 1 種を用いて MAPPs の条件検討を行った。なお、改変体の FcRn 親和性は adalimumab と比較して 10 倍程度高かった。MAPPs 解析の方法は研究方法の項に記載したが、概略を図 2 に示す。本研究ではクロスプレゼンテーションに関わる影響も評価するために、MHC class II の免疫沈降の後に、MHC class I の免疫沈降を行った。

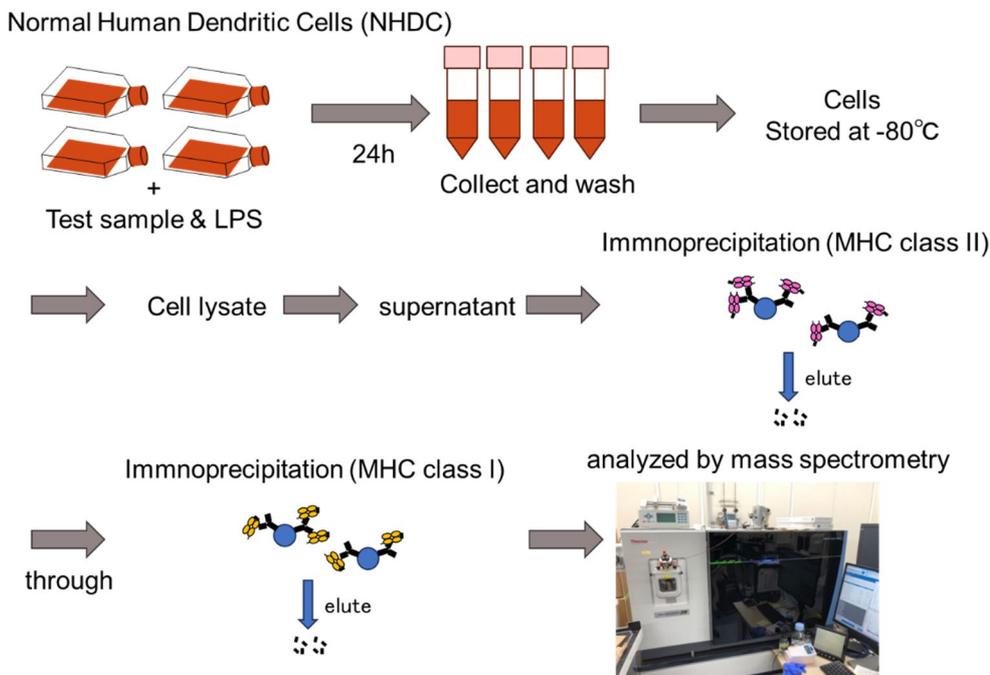


図 2 MAPPs 解析の流れ

図 3 に Adalimumab と改変体について解析した例を示す。抗体単独の試料と共に、それぞれの抗体について抗 Adalimumab 抗体と複合体を形成させた試料についても測定を行った。PEAKS studio を用いて解析を行い、adalimumab もしくは改変体の配列に相当するペプチドを検索したところ、いくつかのペプチドが同定された。特に MHC class II の免疫沈降で溶出されたペプチドでは全ての試料において light chain の定常領域に多くのペプチドがヒットし、クラスターを形成していた(図 3)。Heavy chain でもいくつかのペプチドがヒットしたが、light chain で見られたようなクラスターは認められなかった。なお、アミノ酸置換は heavy chain の定常領域に導入されているが置換部位のペプチドは検出されなかった。また、MHC class I の免疫沈降についてはヒットするペプチドは少なく、やはりクラスターは認められなかった。

MHC class II に提示されやすいと考えられた領域のペプチドについて、試料による量の違いを相対的に比較するために、対象となるペプチドの MS クロマトグラムを同条件で分析してピーク面積を算出した。図 4 に例を示したが、同一領域のその他のペプチドについても同様に比較を行った。ADA と複合体を形成させた抗体は抗体単独よりも数値が高い傾向が見られたが、この例で使用したロットの NHDC では定常領域にペプチドクラスターがあり、使用した ADA も同一の配列をもつため、複合体を形成したことにより高い数値となっているのかは判断不能であった。抗体単独を試料とした場合については、上記で使用したロットを含めて 6 ロットの NHDC を用いて解析を行った。Lot.5,6 については前述の Lot.1 とは異なり、Heavy chain の可変領域にクラスターが見られた(図 5)。一方で Lot.2-4 については、同定されたペプチドが非常

に少なく、また同定されたペプチドの信頼性も低かったことより、これらのロットでは adalimumab が抗原提示されていない(もしくはされにくい)ものと考えられた。抗原提示されないロットが多かったため施行数をもう少し増やす必要があるが、今回主に解析した FcRn 親和性改変抗体 1 種とアダリムマブでは提示されるペプチド量に明確な違いは認められていない。

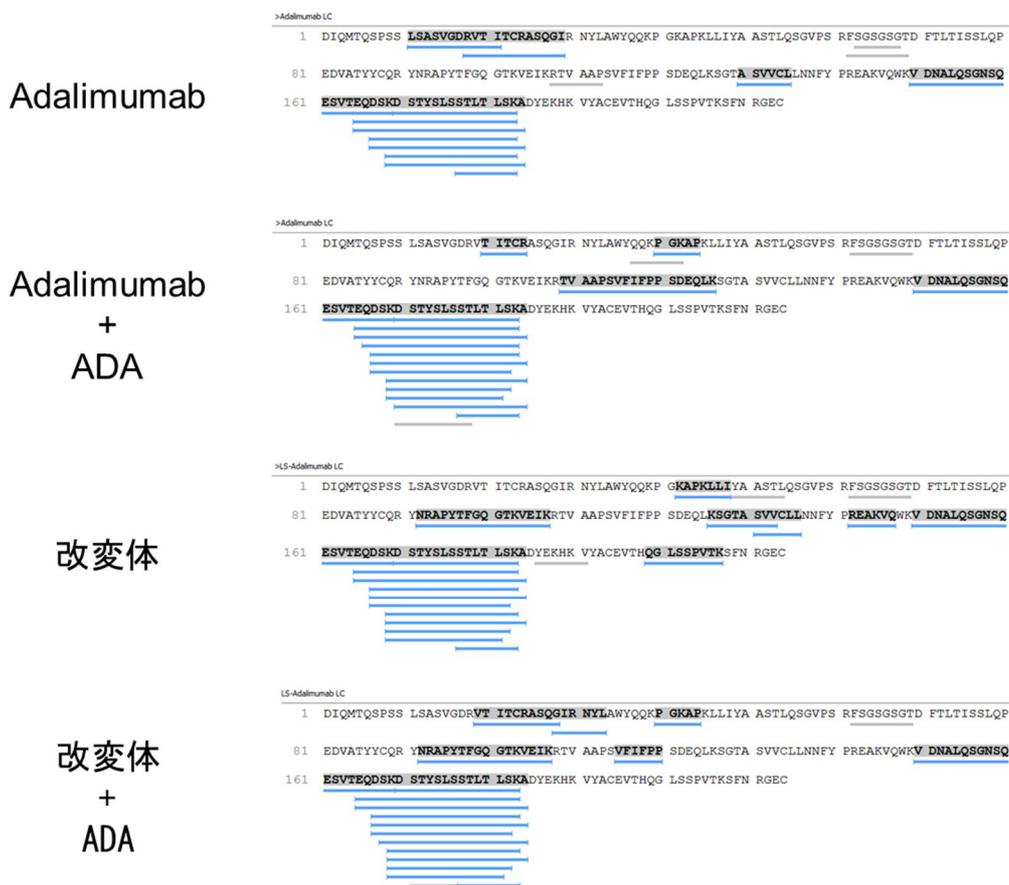


図 3 light chain にヒットしたペプチド (MHC class II の免疫沈降)  
MHC class II には主に 13-25 残基のペプチドが提示されるため、一部短すぎるペプチドもあるが図には一緒に示している。

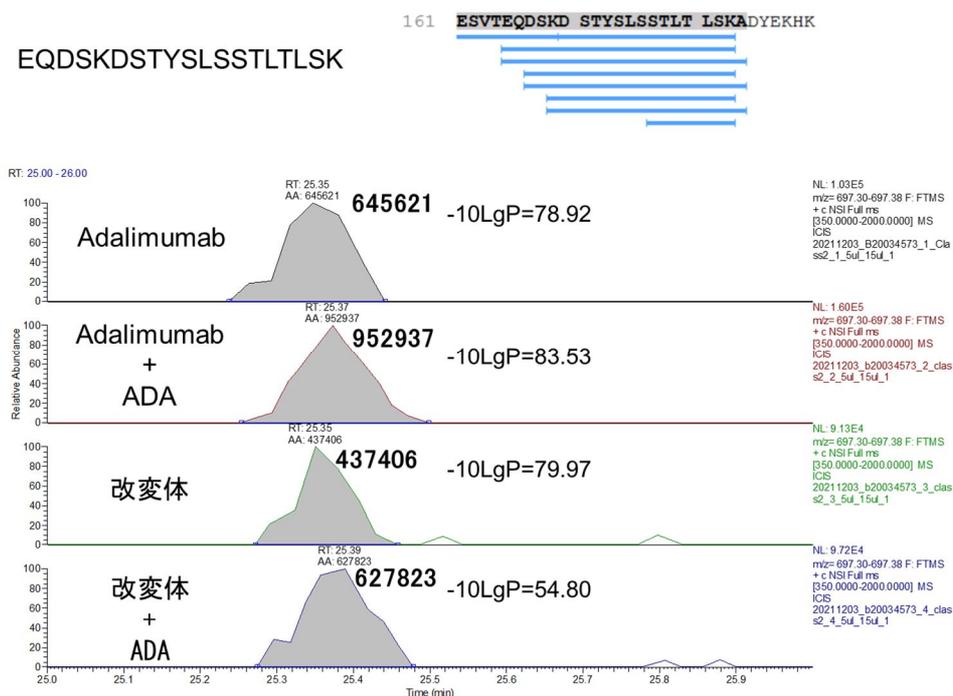


図 4 ペプチドの MS クロマトグラム解析の例  
-10LgP は PEAKS studio で同定されたペプチドの信頼性を表す数値

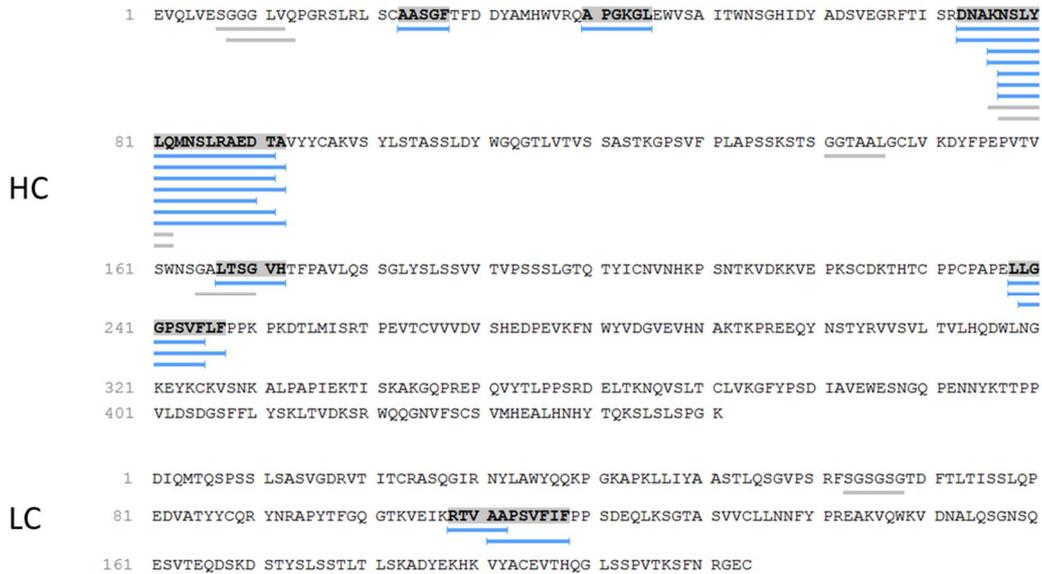


図5 NHDC Lot.6 を用い adalimumab を試料として解析した結果

一方で FcRn 親和性改変体は多種類研究・開発されているため、その他の改変体種でも解析を進めているが、アダリムマブと比較して顕著な差があると考えられる結果が得られてきており、引き続き解析を行う予定である。

抗体医薬品の血中半減期を延長するメリットは非常に大きく、今後も多くの FcRn 親和性改変抗体医薬品が開発されると考えられる。令和 6-8 年度に引き続き研究を進めるところであり、得られる成果は今後の効果的な抗体医薬品類の分子設計につながると共に、FcRn 親和性改変抗体の有効性、安全性に関する知見として非常に重要な意味を持つ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 鈴木 琢雄、石井 明子	4. 巻 285
2. 論文標題 抗体の体内動態制御に関わる受容体FcRnをめぐる話題	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 875 ~ 879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.32118/ayu28510875	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木 琢雄	4. 巻 59
2. 論文標題 FcRn等のFc受容体との親和性に着目した抗体エンジニアリング	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 908 ~ 913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14894/faruawpsj.59.10_908	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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、石井明子
2. 発表標題 FcRn親和性改変抗体の生体内分布に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2023年 ~ 2024年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	橋井 則貴  (Hashii Noritaka)  (20425672)	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長    (82601)	

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
---------	---------