

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82601
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2014
課題番号：23590214
研究課題名(和文)新規Fc受容体DC-SIGN：抗体医薬品の構造特性・機能及び免疫原性との関連

研究課題名(英文)DC-SIGN as a novel Fc receptor: relationship with structure, function and immunogenicity of therapeutic antibodies

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・室長

研究者番号：50291117
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、静注用免疫グロブリン(IVIg)製剤に含まれるシアリル化IgGの受容体として機能し、IVIg製剤の抗炎症作用を担う分子である可能性が報告されたDC-SIGNに着目して、抗体医薬品の構造や機能とDC-SIGNの関連を明らかにすることを目的とした。樹立したDC-SIGN発現細胞を用いた結合性解析の他、低親和性の結合も検出できるSPR法による結合性解析等を行ったが、DC-SIGNとシアリル化IgGの結合は検出されず、IVIg製剤の抗炎症作用におけるシアリル化IgG/DC-SIGNの関与については、両者の直接の相互作用ではなく、別の機構が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the role of DC-SIGN, whose involvement in anti-inflammatory action of intravenous immunoglobulin was reported, in structure and function of therapeutic antibodies. SNA-lectin absorbed fraction purified from intravenous immunoglobulin or recombinant IgG prepared by co-transfection of the plasmids encoding IgG and sialyl transferase were used as sialylated IgG. Binding assay using DC-SIGN expressing cells and Surface plasmon resonance spectroscopy were performed. However, binding between sialylated IgG and DC-SIGN was not observed. Other mechanism than direct binding between DC-SIGN and sialylated IgG may be involved in the anti-inflammatory action of therapeutic IVIg.

研究分野：生物薬品学

キーワード：DC-SIGN

1. 研究開始当初の背景

ベーリングと北里の抗血清療法に端を発する抗体医薬品は、バイオテクノロジーの進展を背景に進化/発展を続け、多数のモノクローナル抗体医薬品が承認されるに至っている。薬効別では主に抗腫瘍薬あるいは免疫調節薬に分類される抗体医薬品には、医薬品売り上げの上位を占める品目も少なくなく、また、薬理学の教科書¹⁾を見ても、その記載の充実度から、重要な医薬品としての認識が高まっていることが分かる。

分子標的薬としてモノクローナル抗体に医薬品に注目が集まる一方で、従来より用いられていたヒト血漿由来ポリクローナル抗体を有効成分とする静注用免疫グロブリン (IVIG: intravenous immunoglobulin) 製剤も、感染症や自己免疫疾患の治療に依然として有用な存在である。免疫系の賦活化により奏功すると考えられる IVIG が、高用量では免疫抑制 (抗炎症) 作用を持つ現象は“IVIG パラドックス²⁾”と言われ、その理由は長らく不明であった。2006 年以降、IVIG 製剤の抗炎症効果が製剤に含まれるシアリル化 IgG の Fc 領域により発揮されること³⁾、DC-SIGN (Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin) がシアリル化 IgG の受容体として機能することが報告され⁴⁾、パラドックス解明のブレークスルーになったと考えられる。しかし、DC-SIGN は糖鎖結合能を持つレクチンであるものの IgG における DC-SIGN 結合部位は糖鎖ではなくタンパク質部分であるとされ、また、DC-SIGN 結合から免疫抑制に至る経路についても明らかにされていないなど、未解明の点も多く残されている。DC-SIGN は樹状細胞における抗原取り込みに関与することが知られているが、抗体医薬品の免疫原性との関連については報告がなかった。

2. 研究の目的

IVIG 製剤の抗炎症作用を担う Fc 受容体として機能することが報告された DC-SIGN に着目して、抗体医薬品の品質安全性と DC-SIGN の関連を明らかにすることを目的とした。シアリル化 IgG と DC-SIGN の結合特性の詳細が明らかにされていなかったため、シアリル化 IgG と DC-SIGN の結合親和性の解析、シアリル化 IgG における DC-SIGN の結合部位の特定、IgG サブクラスによる DC-SIGN 結合性の違い等の解明をめざし、シアリル化 IgG と DC-SIGN の結合性評価を試みた。

3. 研究の方法

(1) DC-SIGN 発現細胞株の樹立

Jurkat 細胞に DC-SIGN 発現プラスミド pVITRO1-neo-DC-SIGNv1 を導入し、G418 による薬剤選別を行った。抗 DC-SIGN 抗体を用いて DC-SIGN 発現を確認し、限界希釈

法によりシングルクローン化し、DC-SIGN 発現細胞 Jurkat/DC-SIGNv1 (6 クローン) を樹立した。

(2) シアリル化 IgG の調製

SNA agarose column (Vector lab. AL-1303) を Binding buffer (TBS/0.1mM CaCl₂) で平衡化し、5 mg/ml の IVIG (Baxter Gammagard) を添加した。カラムを洗浄後、溶出バッファー (TBS/0.5M lactose, 0.2M AcOH/0.5M lactose) で溶出し、非吸着画分及び SNA 結合溶出画分について PD-10 column を用いて PBS にバッファー置換した。別に、CHO 細胞に sialyl transferase と IgG の cDNA を同時にトランスフェクションし、シアリル化 IgG を調製した。

(3) シアリル化 IgG の DC-SIGN 結合能の検討

DC-SIGN 発現細胞として、下記を用いた。

- Jurkat (mock)
- Jurkat/FcγRIIa
- Jurkat/DC-SIGN (line 14)
- Jurkat/DC-SIGN (line 16)

IVIG(original), IVIG SA⁻ (SNA レクチン非吸着画分), IVIG SA⁺ (SNA レクチン吸着画分) について、フローサイトメトリーにより、蛍光標識二次抗体を用いて DC-SIGN 発現細胞への結合を検出した。結合実験におけるシアリル化 IgG の終濃度は、0.1, 1, 10 μg/ml とした。

(4) 表面プラズモン共鳴法を用いたシアリル化 IgG の DC-SIGN 結合能の解析

解析装置は、Biacore T200 を用いた。アミンカップリングにより、DC-SIGN 細胞外ドメインをセンサーチップ CM-5 に固定化した。Running buffer として、10 mM Hepes (pH7.4), 150 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂ を用い、シアリル化 IgG をアナライトとして添加し、センサーグラムを取得した。

4. 結果と考察

(1) DC-SIGN 発現細胞株の樹立

Jurkat 細胞に DC-SIGN をコードする cDNA を導入し、培養後、抗 DC-SIGN 抗体 (anti-CD209) の結合により、DC-SIGN の発現を確認した (図 1)。

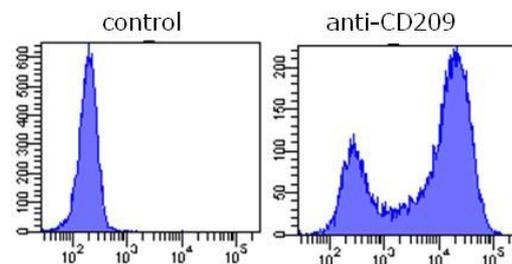


図 1 DC-SIGN 発現細胞の作製

得られた DC-SIGN 発現細胞を限界希釈し、DC-SIGN を発現する細胞株 (Jurkat/DC-SIGNv1) 6 クローンを樹立した。フローサイトメトリーにより、抗 DC-SIGN 抗体を用いて、樹立した各細胞における DC-SIGN 発現を解析した結果を図 2 に示す。各細胞株において、細胞表面における DC-SIGN 発現が確認された。

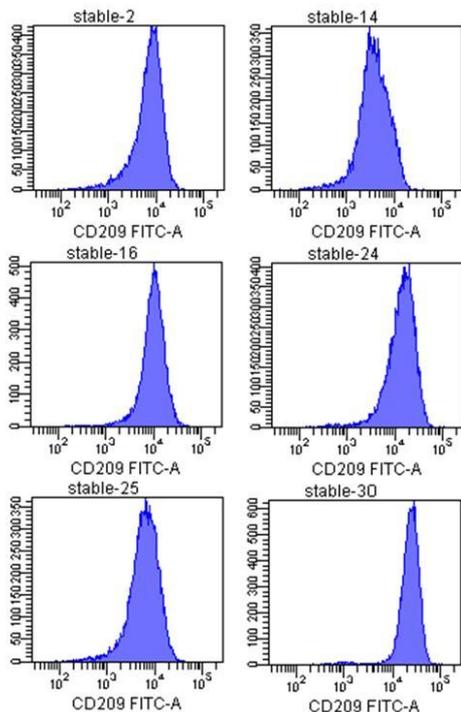


図 2 樹立した細胞株における DC-SIGN の発現確認

(2) シアリル化 IgG の調製

IVIg 製剤よりシアリル化 IgG を得るため、SNA レクチンアフィニティーカラムを用いた精製を行った。図 3 に、SDS-PAGE 及び、SNA レクチンプロットの結果を示す。精製前 (IVIg)、非吸着画分 (FT) と比較し、SNA 吸着画分 (SNA) において、SNA レクチンプロットのシグナルが強く検出され、シアリル化 IgG が濃縮されたことが確認できた。

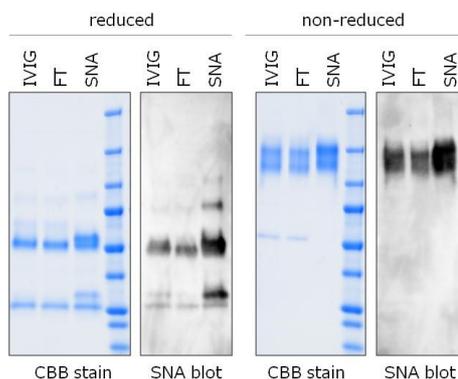


図 3 シアリル化 IgG の調製

(3) Cell-based assay によるシアリル化 IgG の DC-SIGN 結合能の評価

DC-SIGN 発現細胞に対して、シアリル化 IgG を添加し、蛍光標識二次抗体を結合させた後、フローサイトメーターによる解析を行った。高濃度 (100 μ g/ml) の IgG の添加でも特異的な結合は検出されず、本実験系ではシアリル化 IgG の DC-SIGN に対する結合は検出されなかった (図 4)。陽性対照として用いた Fc γ RIIa 発現細胞に対しては、各 IgG の結合が確認された。

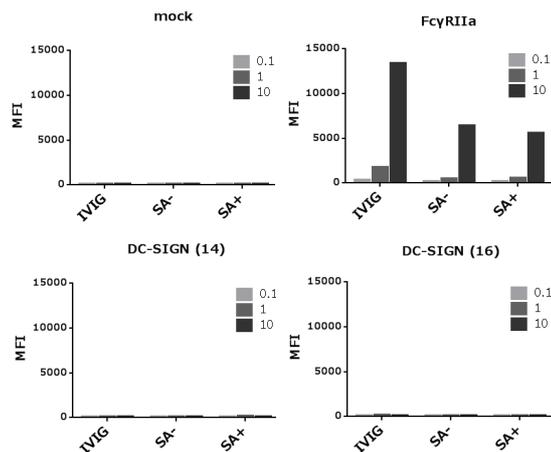


図 4 DC-SIGN 発現細胞へのシアリル化 IgG の結合

(4) 表面プラズモン共鳴法によるシアリル化 IgG の DC-SIGN 結合能の評価

低親和性の結合を検出することが可能な表面プラズモン共鳴法により、DC-SIGN とシアリル化 IgG の結合を解析した。DC-SIGN 細胞外ドメインの組換えタンパク質をセンサーチップに固定化し、シアリル化 IgG をアナライトとして添加した。陽性対象として用いた補体 C1q と DC-SIGN の結合は検出されたが、シアリル化 IgG と DC-SIGN の結合は検出されなかった (図 4)。

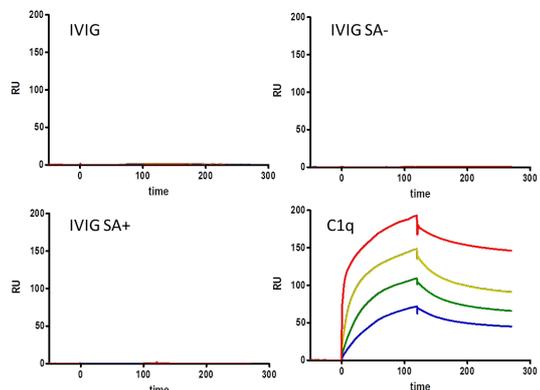


図 4 表面プラズモン共鳴法を用いた DC-SIGN と IgG の結合性評価

別に、シアル酸転移酵素 (ST3 Gal1 あるいは ST6 Gal1) と IgG の共発現によりシアル化 IgG を調製し、同様に結合特性の評価を行ったが、シアル化 IgG の結合は検出されなかった。

本研究の結果、及び、最近の文献情報も考慮すると、IVIg 製剤の抗炎症作用における DC-SIGN の関与については、IVIg と DC-SIGN の直接の相互作用ではなく、別の機構が関与していることが示唆される。

参考文献

- 1) グッドマンギルマン薬理書 (下) 第 10 版(2003 年), 第 11 版(2007 年)
- 2) Nimmerjahn F et al. *J. Exp. Med.* 204, 11, 2007
- 3) Kaneko Y et al. *Science* 313, 670, 2006
- 4) Anthony R et al. *PNAS* 105, 19571, 2008
- 5) Anthony R et al. *J. Clin. Immunol. Suppl* 1 S9, 2010

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) 鈴木琢雄, 多田稔, 石井明子: バイオ医薬品の生物学的性質・免疫化学的性質解析の現状 *Pharm Tech Japan*, 査読無, 28(1), 2012, 57-64
- 2) 石井明子, 鈴木琢雄, 多田稔, 川崎ナナ: 抗体医薬品の分子設計, *薬剤学*, 査読無, 74, 2014, 1-8

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 石井明子, 多田 稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: 抗体医薬品の評価科学, 日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月
- 2) 石井明子, 多田 稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: 抗体医薬品の非臨床評価, 日本薬学会第 134 年会シンポジウム, 2014 年 3 月
- 3) 石井明子: 抗体医薬品 さらなる発展への課題: 規制の観点から 第 39 回日本薬学会関東支部学術講演会, 2014 年 12 月
- 4) 石井明子: バイオ医薬品の品質評価に関する最新動向 JASIS 日本薬局方セミナー, 2014 年 9 月

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Takao Hayakawa, Akiko Ishii-Watabe John Wiley & Sons Inc. *Detection and Quantification of Antibodies to*

Biopharmaceuticals: Practical and Applied Considerations. Japanese Regulatory Perspective on Immunogenicity. 2011 (pp.57-80)

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・
第二室・室長
研究者番号: 50291117

(2) 研究分担者

多田 稔 (TADA, Minoru)
国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・
第三室・室長
研究者番号: 50506954

(3) 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・
第一室・主任研究官
研究者番号: 10415466