

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590229

研究課題名(和文)薬物結合抗体の動態関連分子結合性が細胞内・体内動態に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Influence of the affinities of antibody-drug conjugates for Fc receptors and antigens 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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：薬物結合抗体(抗体薬物複合体：ADC)は細胞傷害性の強い低分子薬物が結合されているため、有効性・安全性確保には適切な薬物放出を含めた動態の制御が重要である。しかし、薬物結合状態が異なることによる結合特性(FcRn、Fc γ R等の受容体結合性や抗原結合性)の変化と、細胞内・体内動態への影響には不明な点が多く、安全性上懸念が残る。このような不明点を明らかにするために、本研究では各種ADCモデルを作製し、抗体への化合物の結合が、抗原や受容体との結合性に及ぼす影響を明らかにすると共に、化合物放出を含めた動態解析手法を構築した。

研究成果の概要(英文)：Since antibody-drug conjugates (ADCs) contain highly cytotoxic small molecules, the regulation of pharmacokinetics (including adequate release of cytotoxic molecules) is important to ensure efficacy and safety of ADCs. ADCs might have different binding properties to FcRn, Fc γ R, and antigen from those of parental antibodies, and their pharmacokinetics might be different by binding state of compounds. However, the influences of the conjugation of compounds on pharmacokinetics have not been fully elucidated. Therefore, we produced various ADC models, elucidated the influences of the conjugation of compounds on the binding properties to antigens and Fc receptors, and established an imaging method that can analyze the release of compounds.

研究分野：医療系薬学

キーワード：薬物結合抗体(抗体薬物複合体) 動態 受容体親和性 抗原親和性 FcRn Fc γ R イメージング 安全性

1. 研究開始当初の背景

近年、抗体医薬品が盛んに開発されており多くの抗体が医薬品として臨床応用されている。また、薬物結合抗体(ADC: Antibody Drug Conjugate)等の先進的医薬品の開発も活発化している。ADC は標的指向性の抗体と薬物を結合した医薬品であり、抗体単独の場合と比較して治療効果が高いことで注目されている薬剤である。国内ではゲムツズマブオゾガマイシンが承認、使用されており、海外では最近 FDA により、brentuximab vedotin が承認された。また、trastuzumab emtansine (T-DM1) や inotuzumab ozogamicin 等が臨床試験中であり、今後多くの ADC が開発、承認されることが予測される (mAbs 3: 331-337, 2011) (国内では 2013 年に brentuximab vedotin と trastuzumab emtansine が承認された)。ADC は標的に結合した後、インターナリゼーションを起こし、リソソームで抗体等が分解されることで薬物を放出、細胞を傷害する。例えば、ゲムツズマブオゾガマイシンは CD33 発現細胞に取り込まれカリケアマイシン誘導体放出により DNA を切断する急性骨髄性白血病治療薬であり、brentuximab vedotin は CD30 発現細胞に取り込まれ抗チューブリン薬であるモノメチルオーリスタチン E を放出して細胞死を引き起こす、一部のホジキンリンパ腫等の治療薬である。抗体医薬品類はその有効性、安全性に血中半減期や分布などの体内動態が重要な働きを担っていると考えられる。ADC では目標とする細胞以外で薬物が放出されることを防ぐ必要があるため、通常の抗体医薬品以上にその薬物動態制御 (標的細胞に取り込まれて薬物を放出すること、標的細胞以外への分布が少ないこと、非特異的に取り込まれた細胞では薬物を放出せずに血中へリサイクリングされること等) が重要であると考えられる。

2. 研究の目的

薬物結合抗体 (ADC: Antibody Drug Conjugate) は細胞傷害性の強い低分子薬物が結合されているため、有効性・安全性確保には適切な薬物放出を含めた動態の制御が重要である。しかし、薬物結合状態が異なることによる結合特性 (FcRn 等の動態関連受容体結合性や抗原結合性) の変化と、細胞内・体内動態への影響には不明な点が多く、安全性上懸念が残る。本研究は、このような動態に関する不明点を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

ADC モデルの作製

抗 HER2 抗体(Trastuzumab)、抗 EGFR 抗体(Cetuximab)、抗 TNF α 抗体(Infliximab)等のリシン残基やシステイン残基に、蛍光色素や biotin を結合させた。多くの ADC モデルの化合物結合数は 4 - 6 分子 / 抗体であっ

たが、システイン残基に化合物を結合させた ADC モデルについては 2-3 分子 / 抗体であった。

FcRn / Fc γ R / 抗原との結合性の解析 (SPR)

FcRn、Fc γ R、抗原 (Her2、EGFR) をセンサーチップ上に固定化し、Biacore T-200 を用いて表面プラズモン共鳴法による解析を行った。主要な条件は以下の通り。

(FcRn)

- FcRn を CM5 チップ (GE healthcare) にアミンカップリングで約 200RU 固定化
- running buf. : 50 mM Sodium phosphate, 150 mM NaCl (pH6)
- 流速 30 μ l/min
- 再生 : 100 mM Tris, 200 mM NaCl (pH8)、3 分

(Fc γ R、抗原)

His capture kit (GE healthcare) を使用した。

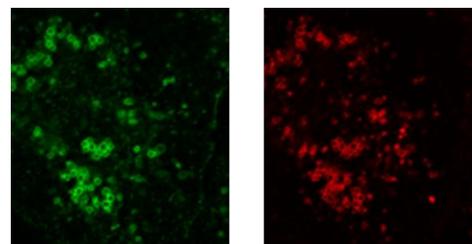
- CM5 チップにアミンカップリングで抗 His-tag 抗体を約 10000RU 固定
- His-tag を付加した抗原 (Her2、EGFR) もしくは Fc γ R (Sino biological) を injection してチップにキャプチャー
- running buf. : HBS-EP+ (GE healthcare)
- 流速 30 μ l/min
- 再生 : Regeneration solution (10 mM glycine-HCl, pH1.5)、1 分

細胞内動態解析

主に、FcRn-EGFP を安定発現する HeLa 細胞、SKOV3-Luc-D3 (Caliper)、SKOV3-Her2-GFP (Sigma-Aldrich) に対し、化合物として蛍光色素を結合させた ADC モデルを添加し、共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Carl Zeiss) を用いて解析した。

4. 研究成果

ADC モデルを作製する前に、FcRn-EGFP を発現する HeLa 細胞に、QD655 で標識した抗体 (Infliximab または Trastuzumab) を添加し、細胞内での局在を確認した (図 1)。



FcRn

QD655

図 1: HeLa 細胞中の FcRn-EGFP と QD655 の蛍光像
QD655-Infliximab を培地に添加し 1 日後。

QD655 の蛍光は FcRn と共局在しているものとしていないものがあり、FcRn と共局在していないものに関しては、lysosome 標識試薬の蛍光と共局在していた (data not shown)。QD655 と結合した抗体は細胞内に取り込まれた後、FcRn と結合し、一部がリサイクリングされずに lysosome に移行していることが確認された。

ADC モデルの作製

QD を用いた場合は一つの QD に複数分子の抗体が結合するため、一般的な ADC とは構造が異なる。そこで、抗体に数分子の蛍光色素、を結合させた ADC モデルを作製した (表 1)。

蛍光色素種類	Infliximab	Trastuzumab	Cetuximab	結合アミノ酸
X680&X780				Lys
A488&A555				Lys
A488&A594				Lys
A488&A647				Lys
A555&A610				Lys
A555&A647				Lys
A555&A660				Lys
A555&X680				Lys
A568&A647				Lys
CF488&CF568				Lys or Cys
CF568&CF633				Lys or Cys
CF568&CF647				Lys or Cys
CF568&CF680				Lys or Cys
CF647&CF680				Lys or Cys

表 1: 作製した ADC モデルの蛍光色素組み合わせ (印を作製)

X: Xenolight (caliper), A: Alexa (Thermo Fisher), CF: CF dye (Biotium)

また、この他に biotin を結合させた ADC モデルも作製した。なお、後述するが、動態解析において、FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を用いて化合物の遊離 (抗体が分解されることによる遊離) 状況を調べるために、蛍光色素は 2 種類を組み合わせ用いている。

ADC モデルの抗原、FcRn、Fc 受容体結合性に関する検討

蛍光色素もしくは biotin を結合した抗体を用いて、化合物の付加が動態関連分子 (抗原、FcRn、Fc 受容体) への結合性に及ぼす影響を解析した。

(1) 抗原結合性

Xenolight680 と Xenolight750 をリシン残基に結合した Cetuximab と Trastuzumab を用いて、抗原 (EGFR もしくは Her2) との結合性の変化を SPR で観察したところ、Cetuximab については化合物を結合することによる抗原結合性の変化は認められなかった。解離が非常に遅いため正確な親和性の変化は算出

できなかったが、Trastuzumab については、化合物を結合することで抗原への結合速度が遅くなっていると考えられた (図 2)。

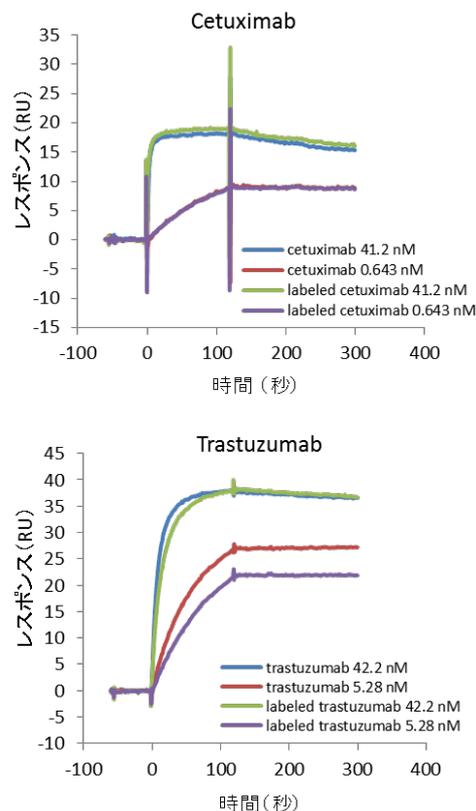


図 2: EGFR と Cetuximab、Her2 と Trastuzumab の結合に対する、化合物結合の影響

リシン残基に化合物を結合しているため、Cetuximab と Trastuzumab の違いは、CDR 領域付近のリシン残基の有無を反映していると考えられる。また、Trastuzumab に関しては、その他の蛍光色素 (CF568 と CF647) や biotin を、リシン残基またはシステイン残基に結合した ADC モデルについても同様に抗原結合性を解析した。その結果、化合物の種類や結合させるアミノ酸によらず、図 2 と似た抗原結合性の低下が認められた (data not shown)。

上記の結果は中性条件下での検討結果であるが、細胞内に取り込まれた ADC は、エンドソームやリソソームなど酸性のコンパートメントに移行する。膜抗原に結合した ADC が細胞内に移行し、酸性条件下で膜抗原から解離する場合、解離した ADC は FcRn と結合して細胞外へリサイクリングされやすくなると考えられる。そのため、化合物の結合が酸性条件下での抗原からの解離に及ぼす影響も解析した。蛍光色素 (CF568 と CF647) や biotin を、リシン残基またはシステイン残基に結合した ADC モデルについて、中性条件で Her2 に結合させ、酸性条件下での解離を測定したところ、測定した ADC モデルに関しては、化合物の結合が酸性条件下での解離へ

及ぼす影響は少ないと考えられた。

(2) FcRn 親和性

作製した ADC モデルについて、FcRn 親和性を解析した。図3に SPR のセンサーグラム (Bivalent analyte model を用いて解析) の例を示す。

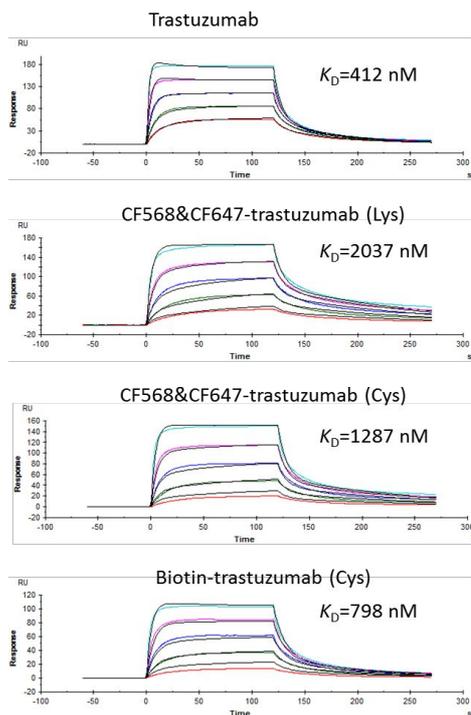


図3：FcRn と ADC モデルの結合 (SPR) の例

化合物を結合させた Trastuzumab の K_D 値は、Trastuzumab と比較して、大きい値となった。リシン残基、システイン残基を問わず、化合物を結合することで、FcRn 親和性の低下が認められた。

(3) Fc R 親和性

3 種類の Fc R (CD16a, CD32a, CD64) と ADC モデルの結合を SPR で測定した。

CF568 と CF647 をリシン残基もしくはシステイン残基に結合させた ADC モデルの結果を例に示す。CD16a については two state model、CD64 については 1:1 binding model で fitting を行い、CD32a については解離が早いため steady state 解析を行った (図4)。

CD32a については、ADC モデルの量の問題で、さらに高濃度の測定が出来なかったため、 K_D 値は示していない。結合させる化合物の分子種によって多少異なるが、化合物の結合により Fc R への親和性も影響を受けると考えられた。

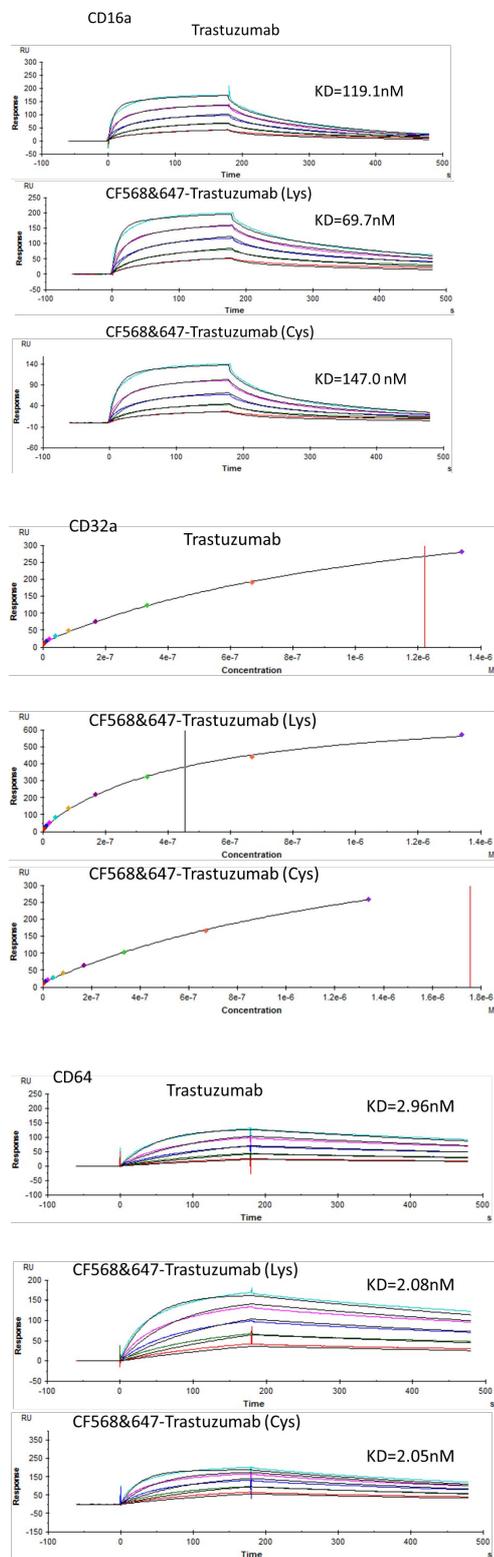


図4：FcγR と ADC モデルの結合 (SPR) の例
上から CD16a、CD32a、CD64

動態解析法の構築

ADC からの化合物の放出 (抗体の分解による化合物の遊離) を検出するために、異なる蛍光波長をもつ 2 種類の蛍光色素を抗体に結合させた。このようにして作製した ADC モデルは、短波長側に蛍光波長を持つ色素 (ドナー) を励起することで FRET が起こり、長波長側の色素 (アクセプター) が蛍光を発する。

一方で、抗体が分解されて色素が遊離すると FRET が起こらなくなる。FRET が起こっている状態でアクセプター色素の photobleaching を行うと、FRET が解消され、ドナー色素の蛍光が強くなるが、遊離した色素の場合は FRET が生じていないためこのような現象は起こらない。

化合物として蛍光色素を結合させた ADC モデルを用いた検討を行い、FRET 効率、細胞の自家蛍光、色素の細胞内小器官滞留性等の観点より、CF568 と CF647 や Alexa568 と Alexa647 の組み合わせが細胞内動態を解析する上で適切であると判断した。

抗原 (Her2) 発現細胞 (SKOV3-Luc-D3) に CF568&CF647-trastuzumab (Lys) を添加し、2 時間後に洗浄、固定を行った場合の結果を示す (図 5)。

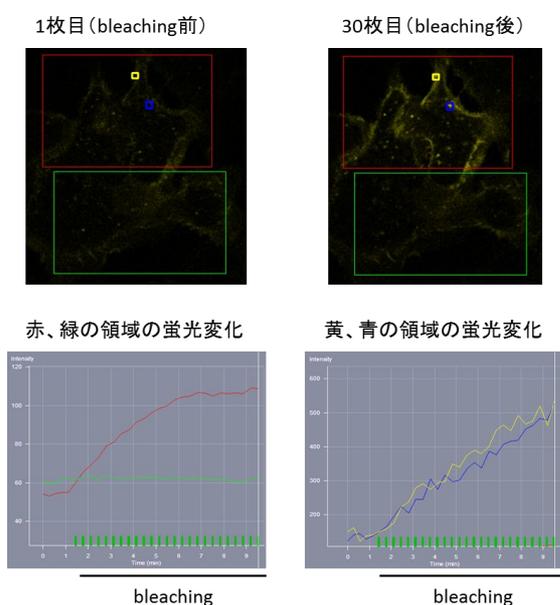


図 5 : SKOV3-Luc-D3 細胞の培地に ADC モデル CF568&CF647-Trastuzumab (Lys) を添加 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) し、2 時間後の蛍光像
赤枠で示した領域は 5 枚目以降 633 nm のレーザーで photobleaching を行った。

経時的に FRET のドナー色素 (CF568) の蛍光画像を取得し、画像取得 5 枚目以降、633nm の蛍光照射によりアクセプター色素 (CF647) の bleaching を行った。Bleaching を行っていない領域 (緑枠) の蛍光強度はほぼ変化がないが、bleaching を行った領域 (赤枠) については、蛍光の上昇が認められた。添加後 2 時間の段階では ADC モデルの多くは細胞膜の抗原に結合している。細胞膜に存在している ADC モデルは分解していないと考えられるため、膜上の ADC モデルの蛍光上昇と比較することで、分解の程度を評価可能であると考えられる。膜上と細胞内に移行した ADC モデルの比較として、bleaching 前は同程度の蛍光強度を示す領域 (黄枠と青枠) の蛍光上昇について比較したところ、ほぼ同等であった。青枠で示した領域の ADC モデルは、細胞

内に移行しているが、化合物は放出していないと考えられる。

本手法を用いることで、化合物放出を含めた ADC モデルの細胞内動態の違いを可能である。また、詳細は Suzuki et al., mAbs, 7:759-769 に記載したが、体内動態については、XenoLight680 と XenoLight750 の組み合わせで ADC モデルを作製し、動物用イメージング装置 (IVIS, caliper) を用いた spectral unmixing 解析を行うことで、組織への集積と化合物の放出 (抗体の分解による化合物の遊離) を同時に解析可能である。これらの手法を用い、引き続き、薬物結合状態の違いが動態に及ぼす影響について検討を行うことで、ADC の安全性確保につながることを期待する。

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 4 件)

Suzuki T, Miyazaki C, Ishii-Watabe A, Tada M, Sakai-Kato K, Kawanishi T, Kawasaki N (2015) A fluorescent imaging method for analyzing the biodistribution of therapeutic monoclonal antibodies that can distinguish intact antibodies from their breakdown products. mAbs 7 (4), 759-769

石井明子, 多田稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ: 次世代抗体医薬品の非臨床評価 (2015) 薬学雑誌 135 (7):857-866

Minoru Tada, Akiko Ishii-Watabe, Takuo Suzuki, Nana Kawasaki (2014) Development of a Cell-Based Assay Measuring the Activation of Fc γ RIIa for the Characterization of Therapeutic Monoclonal Antibodies. Pros One 9 (4), e95787

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 (2014) 薬剤学 74(1): 1-8

[学会発表](計 13 件)

鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 宮崎ちひろ, 川崎ナナ 抗体医薬品の生体内分布に関する蛍光イメージング解析 FcRn 親和性と生体内分布の関連 第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012 年 12 月

多田 稔, 石井明子, 鈴木琢雄, 川崎ナナ 抗体医薬品の酸化が Fc 受容体を介した免疫エフェクター細胞の活性化に及ぼす影響 第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012 年 12 月

鈴木琢雄、宮崎ちひろ、石井明子、多田 稔、川崎ナナ 抗体医薬品の生体内分布に関する蛍光イメージング解析 - 抗体と分解物の分離解析法の開発 - 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月

石井明子、鈴木琢雄、多田 稔、川崎ナナ 表面プラズモン共鳴法を用いた抗体医薬品の Fc 受容体結合特性解析 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月

多田 稔、石井明子、鈴木琢雄、川崎ナナ Fc 受容体発現モデルエフェクター細胞株を用いた抗体医薬品の生物活性評価 日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月

石井明子、西村和子、鈴木琢雄、多田 稔、川崎ナナ ペプチド及びタンパク質医薬品のバイオアナリシス、日本薬物動態学会 第 28 回年会、東京、2013 年 10 月

鈴木琢雄、宮崎ちひろ、石井明子、多田 稔、川西 徹、川崎ナナ 蛍光標識抗体医薬品とその分解物の分離イメージング法 第 22 回日本バイオイメージング学会学術集会、東京、2013 年 9 月

鈴木琢雄、宮崎ちひろ、石井明子、多田 稔、川崎ナナ 未分解抗体と分解物の分離イメージング法の開発と抗体医薬品の生体内分布解析 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月

石井明子、多田 稔、鈴木琢雄、川崎ナナ: 次世代抗体医薬品の非臨床評価 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月

T. Suzuki, C. Miyazaki, A. Ishii-Watabe, M. Tada, T. Kawanishi, N. Kawasaki: Development of a fluorescence imaging method of therapeutic antibodies, which can distinguish degraded products from non-degraded antibodies 2014 AAPS Annual Meeting, (2014.11) San Diego

M. Tada, A. Ishii-Watabe, T. Suzuki, N. Kawasaki: FcγRIIa Reporter Cell Assay for the Characterization of Therapeutic Monoclonal Antibodies 2014 AAPS Annual Meeting, (2014.11) San Diego

A. Ishii-Watabe, M. Tada, T. Suzuki, C. Miyama, N. Kawasaki: Analysis of the binding properties of therapeutic monoclonal antibodies to human, cynomolgus and mouse Fcγ receptors 2014 AAPS Annual Meeting, (2014.11) San Diego

鈴木琢雄、宮崎ちひろ、多田 稔、橋井則貴、

石井明子 FcRn 親和性の違いが抗体医薬品の体内分布などに及ぼす影響 . 日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月

〔図書〕(計 2 件)

石井明子、鈴木琢雄、多田 稔 : FcRn 結合性を利用した次世代抗体医薬品の体内動態制御、次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線 第 6 章-3、シーエムシー出版 (2012、12 月)

鈴木琢雄: 受容体 / 受容体作動性ペプチドなどをもつ融合タンパク質、バイオ医薬品 20 章、化学同人 (2013、8 月)

〔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

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

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号 :