

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790158

研究課題名(和文)抗体医薬品の簡便迅速な標準測定法の開発と薬物動態・薬効評価研究への臨床応用

研究課題名(英文)Development of rapid and simple method for determination of monoclonal antibody drug and its application to clinical samples

研究代表者

大山 要(OHYAMA, KANAME)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：50437860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：キャピラリー電気泳動-タンデム質量分析法を組み合わせ、多検体処理に適した簡便・迅速な抗体医薬の精密測定法の構築を行った。Fab由来のペプチドを分離定量するための、測定条件(緩衝液 pH、濃度、イオン化電圧及び温度)の最適化を行った。続いて、3個のペプチドについてMultiple Reaction Monitoring法で定量性を確認したところ、1個のペプチドが濃度依存的なピークの増加を示し、サロゲートペプチドとして有望であることがわかった。すでに開発している TNF-アルファ;固定化磁気ビーズを用いることで前処理・測定のいずれの段階でも選択性が向上し、高精度な分析法になると予想される。

研究成果の概要(英文)：We developed capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for determination of monoclonal antibody drug in human plasma. In order to selectively determine the Fab peptides derived from the drug after digestion, measurement parameters were optimized. Three peptides were selected and were determined if these were useful to monitor as a surrogate peptide. As a result, the MS signal from one peptide was found to increase as the concentration of antibody drug increased. The combination of this method with the magnetic beads immobilized with TNF-alpha will improve the selectivity for the determination of the antibody drug.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：臨床化学

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬 (mAb) は最も盛んに開発が行われている医薬品群の一つである。その背景としては、ヒト化抗体などの抗体製造技術が完成し、医薬品開発の標的となる疾患関連遺伝子およびタンパク質が解明され、site-specific な治療が可能となった点が挙げられる。既存の化学合成医薬品では治療が困難な疾病において標準的治療薬となりつつある mAb も出現し、今後の更なる増加は必至である。一方、従来の医薬品では血中濃度を測定し、薬効評価および副作用回避に役立っているのが一般的であるのに対し、mAb の血中濃度測定は臨床上ほとんど行われない。しかし、mAb は組織移行や消失速度が遅いといった薬物動態の特徴があり、特に抗体の分解抑制に関与する neonatal Fc receptor が mAb の血中半減期の長期化に寄与する点からも薬物動態の大きな個人差が予想される。事実、mAb を同量投与された患者間で血中濃度に差があり、濃度が比較的高い患者では寛解および Good Response が得られやすいとの報告もある。このように血中濃度と薬効との関係に注目が集まりつつあり、mAb の血中濃度測定の需要が今後増えるとされている。

既存の mAb 測定法は、免疫学的測定法と、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (HPLC-MS/MS) 法に大別される [3]。免疫学的測定法は簡便・迅速測定が可能な反面、内在性タンパク質が抗原抗体反応に干渉し、測定の正確さが失われる場合がある。一方、HPLC-MS/MS 法は血中の mAb をトリプシン消化して得られるペプチドのうち、可変領域 [Fab] 由来のペプチドを分離定量する。しかし、酵素消化に 6 時間以上かかる、血中全タンパク質由来のペプチドが存在し試料成分が複雑となる、HPLC では迅速分離が難しい、測定する Fab 由来のペプチドを mAb ごとにバイオフィオマティクス的手法で決定するなど、多検体処理に不向きな面が多い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、簡便かつ高選択的な前処理操作と、圧倒的な分離能を有するキャピラリー電気泳動-タンデム質量分析 (CE-MS/MS) 法を組み合わせ、多検体処理に適した簡便・迅速な mAb の精密測定法の構築を目指す。具体的には、抗 mAb 抗体を固定化した磁気ビーズにより血中の mAb を選択的に捕集し、パパイン・トリプシン消化により得た mAb の定常領域 (Fc) 由来の複数のペプチドを、CE-MS/MS で分離定量する (右図)。本法の特長は、1) mAb を選択的に捕集・消化することで、測定試料の成分組成を単純化、2) 捕集後のパパイン消化で、mAb の Fc 由来ペプチドを選択的に獲得、3) マイク

ロ波等を利用することで、酵素消化時間を大幅に短縮 (6 時間以上 20 分以内)、4) Fc は各 mAb に共通しており、同一の Fc 由来ペプチドを定量することでいずれの mAb の血中濃度測定も可能、といった点にある。HPLC-MS/MS 法では、膨大な数の血中タンパク消化物が存在する試料中の Fab を測定するのにに対し、本法では新たに考案した前処理法により mAb を選択的に捕集・消化することで、比較的単純な成分組成の試料中の Fc 由来ペプチドを定量する。また、本法は CE を分離法として採用している。CE は HPLC よりもペプチド分離に優れ、HPLC に比べ 10 倍以上分離能が高く、生体成分の迅速分離が可能である。加えて、本法では前処理操作により夾雑成分が大幅に低減されているため、CE による分離時間を秒単位にまで短縮できると考えている。なお、抗 mAb 抗体の外部委託作製費は高額であるが、抗 mAb 抗体を固定化した磁気ビーズは 1 回の測定にわずかしか使用しない。よって、本法の最終的な測定費用は約 500 円/1 検体を見積もっている。

応募者は CE を基盤に生体成分および薬物を数分以内で分離分析できる手法をこれまで数多く開発し (研究業績参照)、CE の高い分離能を証明してきた。また、血清中の抗原-抗体複合体を選択的に捕集し、LC-MS/MS で抗原を一斉同定する新規プロテオーム解析法を開発し、関節リウマチに特異的な抗原を同定している。以上の研究成果と経験が本研究着想の下地となっている。

3. 研究の方法

本研究ではまず、(1) mAb の Fc 由来ペプチドの分離・検出条件を最適化し、CE-MS/MS による一斉分析を実現する。次に、(2) 血液中から mAb を選択的に捕集できる抗 mAb 抗体固定化磁気ビーズを調製し、mAb の Fc 由来ペプチドが検出されるか否かを検証することで、選択性を確認する。それと同時に、マイクロ波照射等による酵素消化時間の大幅短縮について検討する。

引き続き、(3) モデル mAb (インフリキシマブ、キメラ型抗体) 投与患者の血中濃度測定を行い、本法の実用性を検証するとともに、血中濃度と臨床医による効果判定結果とを比較し、有効血中濃度域の有無を調査する。(4) インフリキシマブとは異なる mAb (キメラ型抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体) についても投与患者の血中濃度測定を行い、全タイプの mAb で実用性を評価する。

4. 研究成果

平成 24 年度はまず mAb の Fc 由来ペプチドを分離定量するための、LC-MS/MS 条件

(LC 条件：緩衝液 pH 及び濃度；MS/MS 条件：イオン化電圧及び温度) の最適化を行った。続いて、前処理法 (選択的な mAb 捕集・酵素消化) を確立する目的で、モデル mAb として、関節リウマチ治療薬インフリキシマブを用いた。インフリキシマブのターゲットである TNF- α を、最も高い固定化効率が得られている文献をもとに磁気ビーズへ固定化した。次に、磁気ビーズによるインフリキシマブ捕集後にトリプシン消化を行い、インフリキシマブの Fc 由来ペプチドが検出されるか確認した。具体的には、インフリキシマブ非添加・添加血清をそれぞれ処理し、添加血清でのみ Fc 由来ペプチドが同定・検出されるか調べたところ、該当するペプチドは検出されなかった。そこで、各 mAb に共通する Fc ではなく、固有のアミノ酸配列に関する情報を現在収集しており、これらにターゲットを絞った MRM 分析にて定量を行うための予備検討を行った。また、トリプシン消化の最適化のモデル実験を行い、マイクロ波を利用することで高効率な消化が達成されることを明らかにした。

前年度の結果を受け、平成 25 年度はまず、文献から取得したインフリキシマブの配列情報とヒトタンパク質データベースをもとに、mAb に固有の Fab 由来ペプチドを 3 個選別した。次に Fab 由来のペプチドを分離定量するための、LC-MS/MS 条件 (LC 条件：緩衝液 pH 及び濃度；MS/MS 条件：イオン化電圧及び温度) の最適化を改めて行った。続いて、3 個のペプチドについて Multiple Reaction Monitoring 法で定量性を確認したところ、1 個のペプチドが濃度依存的なピークの増加を示し、サロゲートペプチドとして有望であることがわかった。前年度に開発した TNF- α 固定化磁気ビーズを用いることで前処理・測定のいずれの段階でも選択性が向上し、高精度な分析法になると予想される。さらに現在インフリキシマブ投与患者の臨床検体を収集中であり、治療開始・著効・効果減弱と血中インフリキシマブ濃度の関連性を調べる予定である。

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 2 件)

[1] M. Baba, K. Ohyama, N. Kishikawa, N. Kuroda: Optimization of separation and digestion conditions in immune complexome analysis. *Analytical Biochemistry*, **443**, 181-186 (2013)(査読有)

[2] K. Ohyama, A. Kawakami, M. Tamai, M. Baba, N. Kishikawa, N. Kuroda: Serum immune complex containing thrombospondin-1: a novel biomarker for early rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, **71**, 1916-1917 (2012) (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

[1] 大山 要, 吉見春香、馬場雅子、岸川直哉、黒田直敬：イムノコンプレキソーム解析における免疫複合体の捕集方法についての検討-Protein G、Protein A 固定化磁気ビーズの比較-第 7 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム，仙台，2013 年 11 月

[2] 馬場雅子，大山 要、一瀬邦弘、玉井慎美、岸川直哉、川上 純、黒田直敬：イムノコンプレキソーム解析による自己抗原プロファイリングに基づく自己免疫疾患へのアプローチ。第 7 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム，仙台，2013 年 11 月

[3] 馬場雅子，大山 要，岸川直哉，黒田直敬：イムノコンプレキソーム解析法におけるペプチド分離およびトリプシン消化の最適化。第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム，京都，2012 年 11 月

[4] 大山 要，川上 純，玉井慎美，馬場雅子，岸川直哉，黒田直敬：免疫疾患に関連する免疫複合体抗原のスクリーニングへのイムノコンプレキソーム解析法の応用。第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム，京都，2012 年 11 月

[5] 大山 要，馬場雅子，川上 純，玉井慎美，岸川直哉，植木幸孝，上平 憲，中島憲一郎，黒田直敬：早期関節リウマチ患者のイムノコンプレキソーム解析。第 23 回日本臨床化学会九州支部総会，福岡，2012 年 2 月

〔図書〕(計 1 件)

K. Ohyama, N. Kuroda: Immune complexome analysis. *Advances in Clinical Chemistry volume 60*, Ed. by G. Makowski, Elsevier, Chapter 4, 129-141 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：中枢神経ループス (NPSLE) 診断用バイオマーカー

発明者：一瀬邦弘，大山 要，川上 純，黒田直敬，中嶋秀樹，岸川直哉，馬場雅子

権利者：国立大学法人長崎大学

種類：特許

番号：特願 2013-55543

出願年月日：平成 25 年 3 月 18 日

国内外の別：国内

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

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/analysis/index-j.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

大山 要 (OHYAMA KANAME)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50437860