

平成 30 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：2015～2017

課題番号：15K08087

研究課題名(和文) 抗体医薬品の血中半減期延長技術確立を目指したFcRn親和性の基盤研究

研究課題名(英文) Basic research on neonatal Fc receptor (FcRn) affinity to establish half-life extension technology of therapeutic antibodies

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) 3,700,000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。そのため、投与量や投与頻度の低減を目的とし、FcRnとの親和性を上昇させたFc改変抗体が開発されているが、FcRn親和性の上昇が生体内での血中半減期の延長につながらない例が多い。本研究では、抗体医薬品の血中半減期延長技術確立のためのFcRn親和性に関する基盤研究として、FcRnとアミノ酸改変抗体の結合性に関する研究を実施すると共に、アミノ酸改変による抗体の高次構造への影響やFc受容体結合性の変化等について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic antibodies are protected from degradation by binding to neonatal Fc receptor (FcRn) in endosome and are recycled into plasma, thereby having long half-lives. To prolong the half-lives additionally with the aim of reducing dose and frequency, amino acids-substituted antibodies having high affinity to FcRn are being developed. However, there are cases that the half-lives of the antibodies are not prolonged. As basic researches on neonatal Fc receptor (FcRn) affinity to establish half-life extension technology of therapeutic antibodies, we performed the studies on the binding between FcRn and amino acids-substituted antibodies, and investigated the changes of the conformation and function of IgG (i.e. binding to Fc gamma receptors) by amino acids substitution for raising the affinity to FcRn.

研究分野：医療系薬学

キーワード：FcRn 抗体医薬品 表面プラズモン共鳴 Fc 受容体 半減期延長 アミノ酸改変 HDX/MS

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品はがんや免疫疾患等の治療薬として重要な役割を担うようになり、有効性の向上などを目指して様々な工夫を施した改変抗体医薬品も多く開発されるようになってきた。このような改変抗体の一つとして、投与量や投与頻度の低減を目的とし、新生児型 Fc 受容体 (FcRn) との親和性を上昇させるアミノ酸改変抗体が注目されている。

FcRn は酸性条件下で抗体の Fc 部分と結合し、中性で抗体と解離する性質を持つ受容体である。元来は母親から子への抗体の輸送を司る受容体として発見されたが、成人においても抗体のリサイクリングやトランスサイトーシスに関与していることが明らかになった。また、抗体と同様の機構で、アルブミンのリサイクリングにも関与すること、さらに、最近では抗原提示細胞内で、抗原抗体複体の輸送に関与していることが報告され、その機能は多岐に渡っていることが明らかになっている。

このような背景の元、FcRn 親和性を上昇させてリサイクリング効率を高めることで、血中半減期の延長を狙ったアミノ酸改変抗体の開発が進んでおり、中には臨床試験においてヒトでの血中半減期が 4 倍程度延長した成功例 (motavizumab-YTE) もある。しかし、FcRn 親和性は上昇したものの血中半減期が延長しない、抗体種によってアミノ酸改変による効果が見られないといった事例も多く、血中半減期延長技術は確立されていない。

2. 研究の目的

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。そのため、投与量や投与頻度の低減を目的とし、FcRn との親和性を上昇させた Fc 改変抗体が開発されているが、FcRn 親和性の上昇が生体内での血中半減期の延長につながらない例が多い。我々はこれまでに、FcRn と抗体医薬品の親和性、FcRn 親和性の違いが生体内分布に及ぼす影響等に関する研究を進めている。本研究では、これまでの研究で開発した技術等を用い、特に FcRn とアミノ酸改変抗体の結合性に着目した研究を実施する。本研究成果は、FcRn のリサイクリング機構解明や、半減期延長に有効な抗体医薬品の分子設計につながる。

3. 研究の方法

FcRn 親和性改変による抗体の血中半減期延長技術を確立する上で必要と考えられる事項の内、

- ① 改変抗体と FcRn の親和性の適切な解析方法
- ② Fab 部分が改変抗体と FcRn の親和性に及ぼす影響
- ③ FcRn へのアルブミンの結合が、改変抗体と FcRn の親和性に及ぼす影響
- ④ FcRn 親和性改変が抗体の高次構造に及ぼす影響

を明らかにするための研究を実施した。主な実験方法の概略は以下の通りである。

FcRn 親和性改変抗体の作製

FcRn 親和性の異なる 2 種類の抗体医薬品 (アダリムマブ、オマリズマブ) の配列を基に FcRn 親和性改変抗体の発現ベクターを構築し、CHO 細胞を用いて発現、精製を行った。

FcRn との結合性の解析

(SPR)

FcRn をセンサーチップ上に固定化し、Biacore T-200 (GE healthcare) を用いて解析した。

- ・ FcRn を CM5 チップ (GE healthcare) にアミンカップリングで固定
- ・ running buf. : 50 mM Sodium phosphate, 150 mM NaCl (pH6 もしくは pH7.4)
- ・ 流速 30 μ l/min
- ・ 再生 : 100 mM Tris, 200 mM NaCl (pH9)、3 分

(ELISA)

NeutrAvidin を固相化した 96well plate に biotin 化 FcRn をキャプチャーし、改変抗体との結合を解析した。FcRn は中性では抗体との結合が弱くなるため、サンプルの結合や洗浄には 50 mM NaH₂PO₄, 0.05% Surfactant P20 (pH6) を用いた。結合の検出には SuperSignal ELISA pico (Thermo) を使用した。

Fc γ R との結合性の解析

His capture kit (GE healthcare) を使用し、Biacore T-200 (GE healthcare) を用いて解析した。

- ・ 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 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

高次構造の解析

改変抗体の構造の変化を解析するために、SYNAPT G2S (Waters)を用いて水素重水素交換／質量分析を行った。水素重水素交換時間は 10 sec, 1 min, 10 min, 60 min, 240 min (,7200 min) とし、各点n=3で解析した。なお、LC systemは nanoACQUITY UPLC/HDX manager (Waters)、分析カラムは ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7µm, 1.0×100 mm (Waters) を使用し、0.1%FA, pH2.5 と 0.1%FA, 90%ACN, pH2.5 のグラジエントで分離を行った。

4. 研究成果

FcRn 親和性の異なる 2 種類の抗体医薬品 (アダリムマブ、オマリズマブ) 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抗体 6 種類と、FcRn と結合しないアミノ酸置換を行った抗体 1 種類 (Low) を作製した (図 1)。

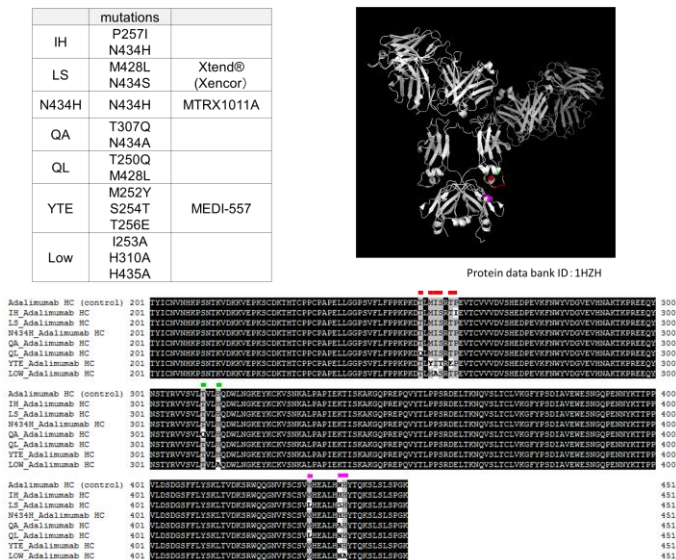


図 1 FcRn 親和性改変抗体のアミノ酸置換部位配列はアダリムマブの例

精製した抗体を電気泳動し、全ての改変抗体は非改変抗体と同様な泳動パターンを示すことを確認した後 (図 2)、ヒト、サル、マウスの FcRn に対する結合を、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いて解析した。SPR を用いた FcRn 親和性の解析方法には様々な解析手法が用いられているため、各種手法を用いた解析を行った。図 3 には FcRn の固定化量を低めに設定し、アナライト (改変抗体) に 2 分子の FcRn が結合するモデルで解析した結果 (bivalent analyte) と、平衡値解析の結果 (steady state) を示した。ヒト FcRn、サル FcRn については、どちらの方法でも同様な親和性の向上が認められた (なお、FcRn と結合しないアミノ酸置換を行った改変体 (Low) は結合が認められなかったため、結合に関する結果は示していない)。一方で、マウス FcRn に関しては、bivalent analyte モデルを用いた場合には、親和性の向上が認められなかった。これまでの報告より、FcRn 親和性を上昇させるアミノ酸改変を導入した抗体はマウス体内での血中半減期が上昇しないことが多い。その点では bivalent analyte モデルの結果と適合しているが、センサーグラムとしては、結合量の増大、解離速度の減少が認められる (図 4)。改変を入れている抗体に関しては、ヒト FcRn とマウス FcRn の親和性は相関が高いことを明らかにしているが、マウス FcRn とヒト IgG の結合は元々解離速度が低めであり、改変を導入することで、解離速度がさらに減少し、bivalent analyte モデルを用いた解析が困難になっていると考えられる。

また、作製した改変抗体について中性条件下 (pH7.4) での結合を確認したところ、ヒトおよびサルの FcRn は IH 改変体との結合が認められた。一方、マウス FcRn は作製した全ての改変体と中性条件下で結合が認められた。FcRn は血管内皮細胞等に取り込まれた抗体と酸性のエンドソーム内で結合し、血中へと放出 (リサイクリング) する働きを持つが、中性条件下で抗体と結合する場合、血中への放出効率が悪くなる。FcRn 親和性を上昇させるアミノ酸改変を導入した抗体はマウス体内での血中半減期が上昇しないことが多いが、これは中性条件下で FcRn と結合することが主な原因であると考えられる。また、IH 改変体はサルでの血中半減期が延長しないことが報告されており、中性条件下でのサル FcRn との結合が原因である可能性がある。

生体での改変抗体の血中半減期は中性条件下での FcRn との結合の影響が大きいと考えられたが、中性条件で結合しない場合には、改変抗体のサル FcRn 親和性 (酸性条件下) とサル

における血中半減期延長（文献値）の相関は高いと考えられた。

なお、酸性条件下では ELISA による結合解析も行った（図 5）。サル FcRn に関しては精度が良好でない改変体もあるが、少なくともヒト FcRn に関しては改変抗体の親和性は上昇していることが示された。しかし、SPR の結果と比較するとその変化は小さかった。

図 3 にはアダリムマブの結果を示したが、オマリズマブについても SPR を用いて同じ解析を実施し、アダリムマブと同様の結果が得られており、改変によるセンサーグラムの形状の変化も同様であった。アダリムマブとオマリズマブは Fab の違いにより FcRn との親和性が変化していると考えられるが、アミノ酸置換による FcRn 親和性の上昇には差が無いと考えられた。

FcRn は pH 依存的にアルブミンとも結合し、アルブミンのリサイクリングにも働いていることが知られている。IgG とアルブミンの結合サイトは FcRn 上の異なる領域で、両者の結合は非競合的であることが知られており、生体内（のエンドソーム）では、抗体とアルブミン両方と結合していると考えられる。そこで、FcRn とアルブミンの結合がアダリムマブ改変体との結合に及ぼす影響について確認したところ、アルブミンの有無で SPR センサーグラム及び算出される親和性に大きな変化は認められなかった。

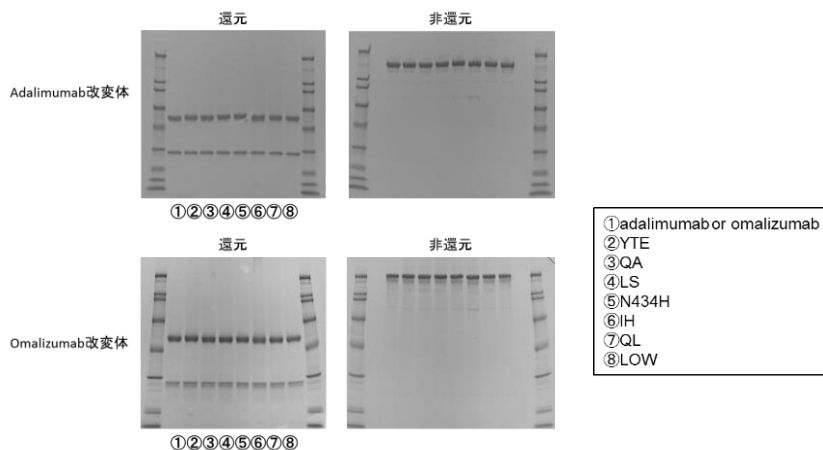


図 2 精製した FcRn 親和性改変抗体の還元、非還元 SDS-PAGE

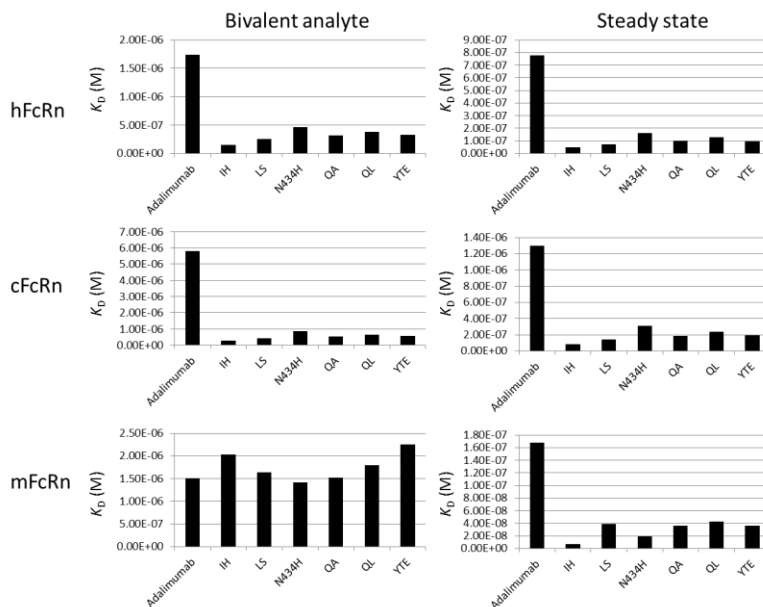


図 3 SPR による FcRn 親和性解析結果（アダリムマブ改変体の例）
hFcRn: ヒト FcRn、cFcRn: サル FcRn、mFcRn: マウス FcRn

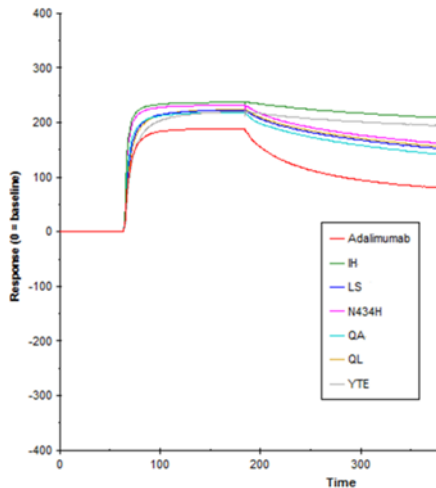


図4 mFcRn とアダリムマブ改変体 670 nM の結合 (SPR センサーグラム)

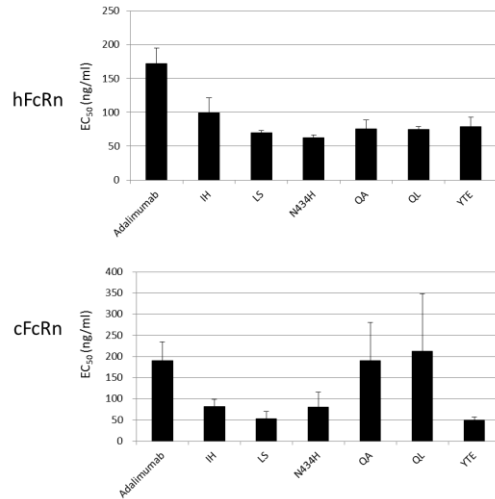


図5 ELISA による hFcRn、cFcRn とアダリムマブ改変体の結合解析

FcRn 親和性改変が抗体の高次構造に及ぼす影響を明らかにするために、アダリムマブ改変体を用いて Fc の機能 (Fc α 受容体結合性) について解析したところ、FcRn 親和性の改変がそれ以外の Fc の機能に影響を及ぼしていることが明らかになった。図 6 にヒト FcRn、CD16a、CD32a、CD64 に対する SPR のセンサーグラムと解析した K_D 値を示した (FcRn の結果は図 3 と同一)。IH、YTE、LOW に関して CD16a との結合が弱くなっていることが確認された。CD32a については親和性が低く、平衡値解析で正確な数値が算出できなかったが、センサーグラムではやはり IH、YTE、LOW に関してレスポンスが減少していた。

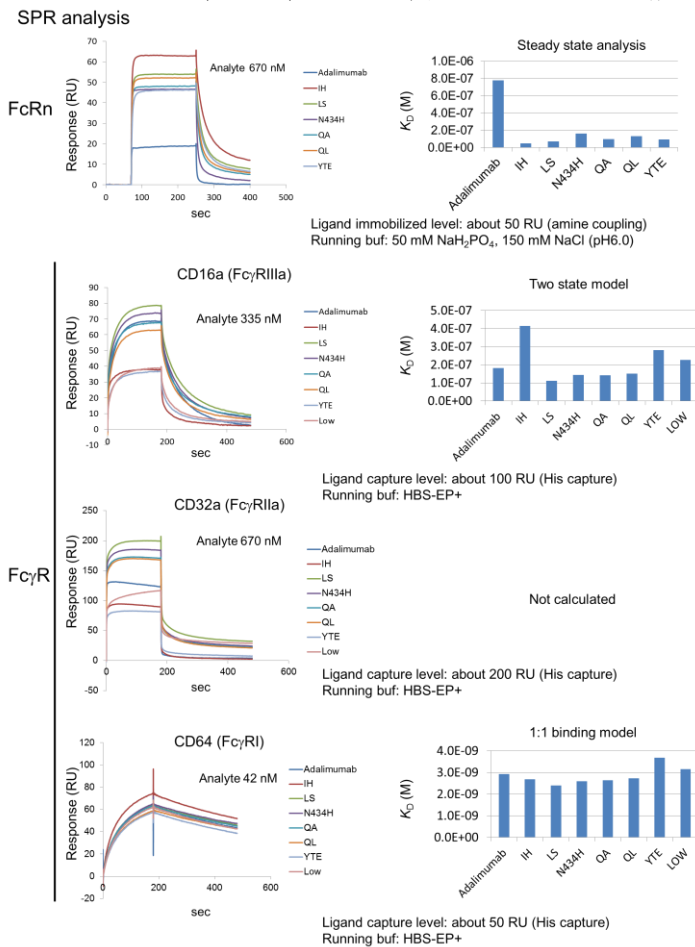


図6 改変抗体と Fc 受容体との結合解析
 左 ; SPR センサーグラム (アナライト 670 nM)、右 ; 親和性解析結果

水素重水素交換／質量分析 (HDX/MS) により構造の変化を解析したところ、FcRn 親和性を改変することにより、Fc 部分等に構造が変化している領域が認められた。図 7 に変化が顕著だった領域の結果を示す。矢印で示した領域の構造変化が引き起こされ、IH、YTE、LOW の順に水素重水素交換を受けやすくなっていると考えられる。本結果は、図 6 に示した CD16a との結合性と相関していた。これらの結果は、例えば FcRn 親和性と Fc γ 受容体親和性の同時改変を行う上でも重要な知見となると考えられる。

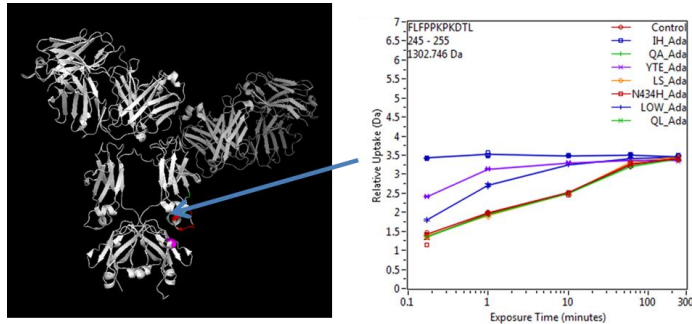


図 7 アダリムマブ改変体の HDX/MS (左図カラーはアミノ酸置換部位、図 1 参照)

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

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 27 日

鈴木琢雄, 東阪嘉子, 橋井則貴, 多田 稔, 岩崎紀之, 石井明子; 抗体の FcRn 親和性改変が Fc γ 受容体結合性や高次構造に及ぼす影響. 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 仙台, 2017 年 6 月 20 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

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

橋井 則貴 (Hashii, Noritaka)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長

研究者番号: 20425672