

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 6 月 11 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 21 年度～平成 23 年度

課題番号：21790172

研究課題名（和文） Fc ドメイン含有タンパク質の生体内分布・分解と半減期に関する研究

研究課題名（英文） Studies on the biodistribution, biodegradation and half-lives of Fc domain-containing proteins.

研究代表者

鈴木 琢雄（TAKUO SUZUKI）

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

研究成果の概要（和文）：

新生児型 Fc 受容体（FcRn）との親和性の違いが、Fc ドメイン含有医薬品の体内分布や分解に与える影響を明らかにすることを目的とし、FcRn 親和性が異なる抗体や Fc ドメイン融合タンパク質の FRET 型蛍光標識体をマウスに投与し、臓器の蛍光を測定した。その結果、FcRn 親和性を大幅に低下させた場合、肝臓や肺への蓄積率に差が認められた。通常の抗体と比較して FcRn 親和性が大幅に異なる Fc ドメイン含有医薬品（例えば薬物結合抗体等）を開発する場合には、体内分布が通常の抗体とは異なる可能性があることを考慮する必要があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate the influences of the affinity to neonatal Fc receptor (FcRn) of Fc domain-containing proteins on their biodistribution and biodegradation, the accumulation of several fluorescent-labeled Fc domain-containing proteins were analyzed in mice. The accumulation ratio of the labeled proteins in liver and lung was altered by lowering their affinity to FcRn. Therefore, in the development of therapeutic antibodies, it seems to be necessary to consider that the structural modification of antibodies which leads to an alteration in the affinity to FcRn may change their biodistribution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,400,000	0	1,400,000
22 年度	900,000	0	900,000
23 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

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：薬物動態・代謝学

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、抗体の Fc 領域と受容体などを

融合させた人工タンパク質も開発され、既存の医薬品とは異なる作用機構により奏功する新世代バイオ医薬品として注目されている。表 1 に抗体および Fc ドメイン融合タン

パク質性医薬品の例を示す。

表 1

名称	構造	標的	血中半減期 (日)
マウス抗体			
Muromonab-CD3	IgG2a	CD3	0.75
Ibritumomab tiuxetan	IgG1k (Y-90標識)	CD20	1.1
Iodine 131 Tositumomab	IgG2aA (I-131標識)	CD20	2.7-2.8
キメラ抗体			
Rituximab	IgG1k	CD20	9.4
Basiliximab	IgG1k	CD25	4.1
Infliximab	IgG1k	TNF α	9.5
Cetuximab	IgG1k	EGFR	4.8
ヒト化抗体			
Daclizumab	IgG1k	CD25	20
Palivizumab	IgG1k	RSV F protein	19-27
Trastuzumab	IgG1k	HER2	2.7-10
Gemtuzumab ozogamicin	IgG4k (カリケアマイシン結合)	CD33	1.9-2.5
Alemtuzumab	IgG1k	CD52	12
Omalizumab	IgG1k	IgE	20
Bevacizumab	IgG1	VEGF	11.7-13.4
ヒト抗体			
Adalimumab	IgG1k	TNF α	14.7-19.3
融合タンパク質			
Etanercept	TNFR + Fc	TNF	4
Alefacept	LFA3 + Fc	CD2	11.3
Abatacept	CTLA4 + Fc	CD80/CD86	13.1
Rilonacept	IL-1R+Fc	IL-1	8.6

Lobo E.D. et al. J Pharm Sci. 93, 2645, 2004をもとに改変

これらの医薬品の血中半減期を比較すると、マウス抗体、キメラ抗体は半減期が短い傾向があるが、ヒト化・ヒト抗体では、薬効にインターナリゼーションなどの分解機構が関与していると考えられる Trastuzumab (トラスツズマブ) や Gemtuzumab ozogamicin (ゲムツズマブ オゾガマイシン) を除くと 20 日前後のものが多い。一方、抗体 Fc 領域と膜タンパク質細胞外ドメイン等を融合させたタンパク質はヒト由来タンパク質であるものの、血中半減期は短い。

Fc ドメインを有するタンパク質の体内動態には新生児型 Fc 受容体 (FcRn) が大きな影響を及ぼすと考えられる。FcRn は細胞内に取り込まれた IgG の Fc 領域と酸性条件下で結合することで、リサイクリング効率を上昇させ、血中半減期を延長する役割が知られている。また、FcRn はトランスサイトーシスによる IgG の輸送にも関わっているとされており、生体内分布にも影響を与えると考えられる。

申請者はこれまでに、Fc ドメイン融合タンパク質の FcRn に対する結合親和性が、抗体と比較して低いことを明らかにし、抗体と Fc ドメイン融合タンパク質では FcRn によるリサイクリング効率や生体内分布が異なる可能性を示した。しかし、FcRn 親和性の違いと体内分布の関係については研究が進んでおらず、どの程度体内分布が変化し得るかは不明である。

今後融合タンパク質医薬品を含め FcRn との親和性が通常の抗体とは異なる抗体医薬品は急激に増えていくと予想される。医薬品の体内分布は有効性・安全性に関わる重要な要素であることから、FcRn 親和性と体内分布、分解の関係について明らかにする必

要性がある。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光標識体を用いたイメージング技術により、FcRn 親和性が生体内分布、分解に与える影響を明らかにすることが目的である。抗体や融合タンパク質の分布だけでなく分解についても評価するために FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 型のタンパク質標識を行ない、マウスでの臓器蓄積率などについて検討を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス FcRn (mFcRn) に対する親和性測定法

CHO 細胞を用いて mFcRn 細胞外領域を発現させた。精製した mFcRn をリガンド、各種 Fc ドメイン含有タンパク質をアナライトとして SPR 測定装置 (BIAcore 3000) を用いて親和性を測定した。

FcRn 細胞外領域をセンサーチップ CM5 (BIAcore) にアミンカップリングキット (BIAcore) を使用して約 300RU 固定化した。Running 緩衝液として 50 mM sodium phosphate / 150 mM NaCl (pH6.0) を使い、流速 20 μ l/分 で Fc ドメイン含有タンパク質をインジェクションした (KINJECT、結合 120 秒、解離 150 秒)。再生用緩衝液は 100 mM Tris / 200 mM NaCl (pH8.0) とし、4 分間送液した。得られたセンサーグラムは、bivalent analyte model で解析した。

(2) アミノ酸置換アダリムマブの作製

FcRn との親和性を変化させるためにアミノ酸置換を行った抗体 (アダリムマブ) 2 種 (I253A / H310A / H435A 及び T250Q / M428L) を CHO 細胞で発現させた。Protein A もしくは protein G カラムを用いて精製を行い、mFcRn との親和性測定を行った。

(3) Fc ドメイン含有タンパク質の蛍光標識

蛍光色素 XenoLight CF680 と XenoLight CF750 (Caliper) を用いて Fc ドメイン含有タンパク質 (インフリキシマブ、アダリムマブ、エタネルセプト、アミノ酸置換アダリムマブ) の標識を行った。Fc ドメイン含有タンパク質 1 分子に対しそれぞれの色素がほぼ 2~4 分子となるように、1 級アミンに色素を結合した。標識体の蛍光スペクトルは FlexStation (Molecular Devices) を用いて測定した。

(4) 蛍光標識タンパク質のマウスへの投与及び蛍光観察

Balb/c AJcl-nu/nu マウス (日本クレア) に、蛍光標識タンパク質を 10 mg/kg 尾静脈投与した。投与後 1~3 日後に臓器を摘出し、

IVIS Lumina II (Caliper)を用いて蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) mFcRn 親和性測定系の開発と FcRn 親和性の異なる Fc ドメイン含有タンパク質の選択

CHO 細胞で発現させた mFcRn 細胞外領域を pH5.8 で IgG カラムに結合させ、洗浄後、pH8.1の緩衝液で溶出を行った。得られた精製 mFcRn をセンサーチップに固定化し、各種 Fc ドメイン含有タンパク質 (42~670 nM) をインジェクションした。センサーグラムの例を図 1A に示す。Bivalent model を用いた解析で良好なフィッティングが得られた。

結合標的が同一 (TNF α) であるアダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプトの mFcRn との解離定数を比較したところ、ヒト FcRn (hFcRn)と同じく、融合タンパク質であるエタネルセプトはアダリムマブ、インフリキシマブよりも解離定数が大きかった (図 1B)。これより、これらの Fc ドメイン含有タンパク質は mFcRn 親和性が異なる分子として、分布、分解の違いの検討に使用できることが明らかとなった。

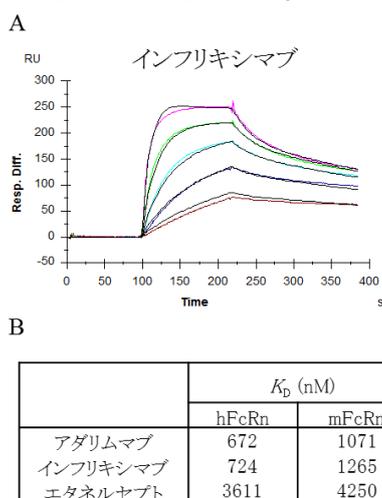


図 1 A) mFcRn 親和性測定センサーグラム (インフリキシマブを 670, 335, 168, 84, 42 nM の濃度でインジェクション)、B) アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプトの hFcRn と mFcRn 親和性の比較

また、FcRn 親和性が異なる分子として使用するために、アミノ酸置換を行ったアダリムマブ 2 種の作製を行った。CHO 細胞で発現させたアミノ酸置換アダリムマブを精製し、mFcRn との親和性を測定したところ、I253A/H310A/H435A の置換を導入したアダリムマブは mFcRn との結合が認められな

かった。一方 T250Q / M428L の置換を導入したアダリムマブの mFcRn 親和性はインフリキシマブやアダリムマブと大きく変わらなかった。このため、FcRn 親和性の異なる Fc ドメイン含有タンパク質として、アダリムマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、低親和性アダリムマブ (I253A / H310A / H435A) の 4 種の比較を行うこととした。

(2) Fc ドメイン含有タンパク質の蛍光標識法の検討

Fc ドメイン含有タンパク質を標識する際、単一の蛍光色素で標識を行うと、切断されていない標識体と分解物の区別がつかない。そこで、2 種の蛍光色素で標識し、蛍光共鳴エネルギー遷移 (FRET) 効率の変化から分解に関する情報を得ることを試みた (図 2A)。

図 2B にインフリキシマブを XenoLight CF680 (XenoLight 680) と XenoLight CF750 (XenoLight 750) で二重標識した例を示す。切断されていない標識体 (-proteinase K) と分解物 (+proteinase K) の蛍光スペクトルを比較したところ、切断されていない標識体では励起された XenoLight 680 のエネルギーが XenoLight 750 に遷移し、XenoLight 680 の蛍光値が低くなっていた。

これより、XenoLight 680 を励起した場合の [XenoLight 750 の蛍光/XenoLight 680 の蛍光] を測定することで、分解物量に関する評価が行えると考えられた。

なお、長波長側の蛍光色素 (XenoLight 750) を直接励起し、蛍光を測定することで、分解していない標識体と分解物を合わせた蓄積量とした。

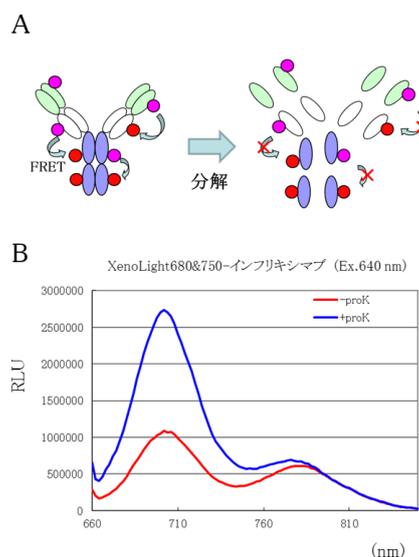


図 2 A) 二重標識抗体のイメージ図、B) XenoLight 680 と XenoLight 750 で二重標識したインフリキシマブの蛍光スペクトル

これらの標識体について mFcRn 親和性を測定したところ、標識前よりも親和性が低下したものの、FcRn 親和性が異なる分子として使用できると考えられた (表 2)。なお、エタネルセプトに関しては二重標識を行った場合の FRET 効率が低かったため、標識数を増やすことで FRET 効率を上昇させた。

	標識数/抗体(平均値)		mFcRnとの親和性 (K _D)
	Donor	Acceptor	
XenoLight680&750-アダリムマブ	2.0	2.1	2.2 μM
XenoLight680&750-インフリキシマブ	2.5	2.5	3.7 μM
XenoLight680&750-エタネルセプト	4.0	4.1	5.1 μM
XenoLight680&750-低親和性アダリムマブ (I253A, H310A, H435A)	2.0	2.1	結合しない

表 2 標識 Fc ドメイン含有タンパク質の蛍光標識数と mFcRn 親和性

(3) 蛍光標識 Fc ドメイン含有タンパク質の臓器蓄積と分解物量に関する評価

蛍光標識を行った Fc ドメイン含有タンパク質を雌のヌードマウスに尾静脈投与し、投与後 1 日及び 3 日後に脾臓、肝臓、肺、心臓、腎臓、子宮を摘出して IVIS lumina II を用いて蛍光を測定した。

まず、XenoLight750 を直接励起し、分解物も含めた臓器蓄積量を見積もった。観察した臓器の蛍光量の総和を 100%として、それぞれの臓器の蛍光蓄積率を計算したところ、FcRn 親和性が低くなるほど肝臓への蓄積率が高くなり、肺への蓄積率が低くなる傾向が認められた (図 3)。

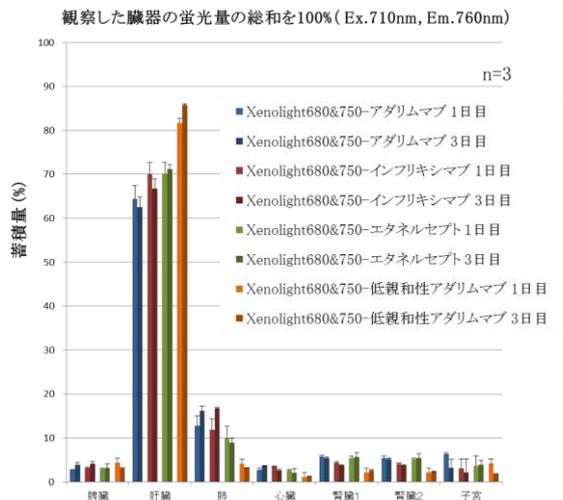


図 3 標識体 (分解物も含む) の臓器蓄積率

アダリムマブと低親和性アダリムマブに関してはアミノ酸配列がほぼ同一であり、同一条件で標識を行うとほぼ同数の蛍光色素が結合した。このため、臓器への蓄積率だけでなく、実際に測定された蛍光値による比較も行った。この結果、肝臓では標識低親和性

アダリムマブを投与した時の蛍光値が、標識アダリムマブを投与した時の倍程度であった。タンパク質と結合していない色素を投与した場合、多くが体外に排出され、肝臓等への蓄積量は低いことより、標識低親和性アダリムマブは分解していない状態で肝臓へ取り込まれていると考えられた。

次に、675 nm で励起し、760 nm の蛍光フィルターを用いた蛍光値と 720 nm の蛍光フィルターを用いた蛍光値の比を求めた。図 4 に標識アダリムマブと標識低親和性アダリムマブの結果を示す。全体として 1 日目よりも 3 日目の数値が低く、1 日目よりも 3 日目で分解物の割合が増加していると考えられた。

また、標識低親和性アダリムマブの肝臓での数値は、標識アダリムマブもしくはその他の臓器の数値と比較して低い値ではなく、肝臓における標識低親和性アダリムマブの分解物の割合は高くないことが示唆された。

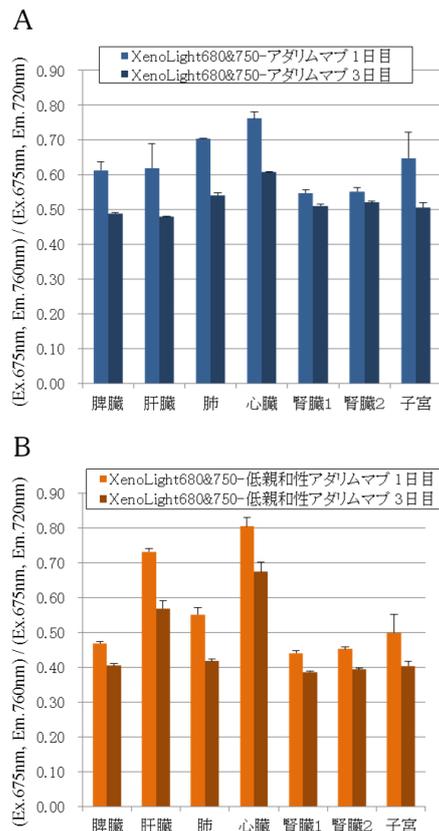


図 4 標識アダリムマブ、標識低親和性アダリムマブの各臓器の FRET 効率比較

本研究により、FcRn 親和性が大幅に低下した場合、肝臓や肺への蓄積量が変化する可能性が示された。特に肝臓においては倍程度に蓄積量が増加した。標識低親和性アダリムマブをマウスに投与した場合、血中濃度を ELISA で定量すると、投与 1 日目で投与 5

時間後の 20%程度、投与 3 日目では数%まで減少する。血中からは急速に消失するにも関わらず、肝臓への蓄積が見られるのは、肝臓で細胞内に取り込まれたタンパク質が血中にリサイクルされず、蓄積している可能性が考えられる。一方、標識低親和性アダリムマブは肺への蓄積量が低かったが、FcRn は肺で IgG のトランスサイトーシスに関わっているとされており、FcRn 親和性が低下することでトランスサイトーシス効率が低下し、蓄積が低くなっている可能性が考えられる。本研究では検討を行うことが出来なかったが、今後 FcRn 親和性を大幅に上昇させた Fc ドメイン含有タンパク質を用いて、肺や他の臓器への蓄積量の変動を検討することで、より FcRn 親和性と体内分布に関する理解が深まるものと考えられる。

今後、Fc ドメイン含有医薬品として、FcRn 親和性が通常の抗体と大きく異なる医薬品が開発される可能性がある。例えば、血中半減期延長を目的に、FcRn との親和性を高めるアミノ酸置換を導入する場合や、抗体に薬物を結合させた Antibody Drug Conjugate で、薬物の導入により FcRn との親和性が低下する場合等である。このようなケースでは通常の抗体とは異なる体内分布を示す可能性があることを考慮する必要があると考えられる。

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 3 件)

- ① Suzuki T, Ishii-Watabe A, Tada M, Kobayashi T, Kanayasu-Toyoda T, Kawanishi T, and Yamaguchi T (2010) Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: A comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. *J. Immunol.* 184: 1968-76
doi: 10.4049/jimmunol.0903296
- ② Ishii-Watabe A, Saito Y, Suzuki T, Tada M, Ukaji M, Maekawa K, Kurose K, Kaniwa N, Sawada JI, Kawasaki N, Yamaguchi T, Eguchi Nakajima T, Kato K, Yamada Y, Shimada Y, Yoshida T, Ura T, Saito M, Muro K, Doi T, Fuse N, Yoshino T, Ohtsu A, Saijo N, Hamaguchi T, Okuda H, Matsumura Y. (2010) Genetic polymorphisms of FCGRT encoding FcRn in a Japanese population and their functional analysis. *Drug*

Metab Pharmacokinet. 25: 578-587

<http://dx.doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-067>

- ③ 石井明子, 鈴木琢雄, 多田 稔, 川西 徹, 山口照英, 川崎ナナ: 抗体医薬品の体内動態制御に関わる受容体: FcRn 日本薬理学会誌 136(5), 280-4 (2010)
<http://dx.doi.org/10.1254/fpj.136.280>

[学会発表] (計 6 件)

- ① 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 宮崎ちひろ, 加藤くみ子, 川西 徹, 山口照英, 奥田晴宏, 川崎ナナ 抗体医薬品類の FcRn 親和性と生体内分布に関する蛍光イメージング解析 日本薬学会第 132 年会、北海道、2012 年 3 月
- ② 石井明子, 多田 稔, 鈴木琢雄, 川崎ナナ 抗体医薬品の評価科学 日本薬学会第 132 年会、北海道、2012 年 3 月
- ③ 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 宮崎ちひろ, 加藤くみ子, 山口照英, 川西 徹, 川崎ナナ 抗体医薬品類の FcRn 親和性の違いと生体内分布への影響に関する研究 第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年 9 月
- ④ 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 小林 哲, 豊田淑江, 川崎ナナ 抗体医薬品類のヒトおよびマウス新生児型 Fc 受容体 (FcRn) に対する親和性の比較 日本薬学会第 131 年会、静岡、2011 年 3 月
- ⑤ 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 小林 哲, 豊田淑江, 川西 徹, 山口照英 抗体医薬品と Fc ドメイン融合タンパク質医薬品における胎児性 Fc 受容体 (FcRn) 親和性の差異に関する検討 日本薬学会第 130 年会、岡山、2010 年 3 月
- ⑥ 鈴木琢雄, 石井明子, 多田 稔, 小林 哲, 豊田淑江, 川西 徹, 山口照英 抗体医薬品および Fc ドメイン融合タンパク質医薬品の Fc 受容体 (FcRn および FcγRI) との結合特性比較 第 82 回日本生化学会大会、神戸、2009 年 10 月

[図書] (計 3 件)

- ① 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子: バイオ医薬品の品質・安全性評価シリーズ、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*(2012) 28: 57-64
- ② 中澤志織, 橋井 則貴, 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子, 川崎ナナ バイオ医薬品の品質・安全性に関する最近の話題ーバイオ医薬品の開発、製造、及び臨床試験の安全性確保における特性理解の重要性ー(2012) *レギュラトリーサイエンス学会誌* 2(1): 21-30
- ③ 鈴木琢雄, 多田 稔, 石井明子: 生物学

的性質解析および免疫学的性質解析、先端
バイオ医薬品の評価技術 第9章-3、シー
エムシー出版 (2010) p197-211

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 琢雄 (TAKUO SUZUKI)

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