

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293037

研究課題名(和文) 個別化医療に向けた抗体医薬品の標的分子の糖鎖構造と薬効・体内動態の関係の解明

研究課題名(英文) Study on the structure and function of glycans in target proteins for moving toward individualized medicine using antibody drugs

研究代表者

川崎 ナナ (Kawasaki, Nana)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：20186167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬品の個別化医療の実現に向けて、標的分子の多様性と抗体との反応性の関係を明らかにする必要がある。本研究では、抗体医薬品標的タンパク質の糖鎖の多様性を明らかにすることを目的として、抗体医薬品を用いた免疫沈降、トリプシン消化、アセトン沈殿による糖ペプチドの濃縮、及びLC/MSにより部位特異的に糖鎖構造を解析する方法を開発した。この方法により、ヒト上皮様細胞癌由来A431細胞株のEGFRの5結合部位の糖鎖を明らかにし、Asn528に7-9個のGlcNAcと2-6個のFucからなる多様な糖鎖が結合していることを確認した。また、ヒト及びBHK細胞由来Fc Rの部位特異的糖鎖構造も明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For individualized medicine using monoclonal antibody drugs (mAbs), it is important to clarify the diversity of target molecules for mAbs and the relationship between the diversity and efficacy and safety of mAb products. To elucidate the glycan diversity on target proteins for mAbs, we developed an analytical method for the site-specific glycosylation of membrane proteins; this method comprised the extraction of target proteins from the membrane fraction by immunoprecipitation with mAbs, trypsin digestion, glycopeptide enrichment by acetone precipitation, and LC/MS. Using the method, we successfully demonstrated the glycosylation at 5 sites of EGFR in A431 cells. It was suggested that Asn 528 is attached to unique glycans bearing both 7-9 GlcNAc and 2-6 Fuc residues. We also showed the site-specific glycosylation of the Fc gamma receptor IIIb expressed in Baby hamster kidney cells and in human serum.

研究分野：糖鎖生物学 質量分析学 バイオ医薬品

キーワード：糖鎖 質量分析 EGF受容体 抗体医薬品

### 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品は関節リウマチや一部の悪性腫瘍等の治療で優れた臨床効果をあげているが、患者により治療効果が異なること、また過剰な薬効発現や免疫反応の活性化に伴う有害反応を引き起こすことが知られている。その対策の一つとして、治療効果が期待される被験者・患者を選別し、適切な用量を投与する個別化医療が推進されている。個別化医療の実現に向けて、抗体医薬品の標的の有無を評価する方法、及び、標的の分子多様性と薬物との反応性の関係を明らかにすることが求められている。現在、遺伝子解析・発現解析を中心とした個別化医療研究が行われているが、ゲノム解析結果から治療効果・有害反応を説明できないケースが多く存在することがわかってきた。

多くの標的抗原や、抗体医薬品の薬理作用や体内動態制御に関与する Fc 受容体 (FcR: Fc 受容体, FcRn) は糖タンパク質である。一般に、糖タンパク質の糖鎖は高次構造や分子間相互作用を制御することにより、タンパク質の機能や体内安定性を調節することが知られている。また、糖鎖構造や不均一性は疾患によって変動すること、及び個人によっても異なることが報告されている。糖鎖の機能と多様性に関するこれらの知見から、標的抗原および FcR の糖鎖が抗体医薬品の薬効発現や作用時間を調節している可能性が考えられ、糖鎖の多様性が薬効や副作用等の個人差に関与している可能性が強く示唆される。

### 2. 研究の目的

これまでに、抗体医薬品の標的抗原である EGF 受容体 (EGFR) や HER2 において、糖鎖構造がその機能に影響を及ぼすことなどが報告されているが、受容体の糖鎖の構造と、その糖鎖が抗体医薬品との反応性に及ぼす影響についてはほとんど研究が進んでいない。また、EGFR や FcR の糖鎖構造に関する研究は遺伝子組換えタンパク質を用いたものに限られており、内在性の受容体の糖鎖構造とその機能については不明な点が多い。そこで、本研究では、個別化医療に向けた抗体医薬品の有効性・安全性確保のため、EGFR などの標的抗原および FcR の糖鎖構造とその多様性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養とタンパク質抽出

細胞試料として、EGFR の過剰発現株として知られるヒト上皮様細胞癌由来細胞株 (A431 cell line) を用いた。A431 細胞を播種し、DMEM 培地 (10% FBS, 1% PS) 中で 70~80% コンフルエントになるまで培養し、PBS (プロテアーゼ阻害剤含有) で洗浄後、セルスクレーパーで細胞を回収した。全タンパク質は、市販の IP RIPA buffer (Thermo Scientific; 25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1

mM EDTA, 1% NP-40, 5% glycerol) を用いて、また、膜関連タンパク質は、ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit (Calbiochem) のプロトコルに準拠して抽出した。

#### (2) ウエスタンブロッティング解析

抽出したタンパク質をポリアクリルアミドゲルで分離し、PVDF 膜へ電氣的に転写した。5% Blocking Reagent (GE ヘルスケア) で 4 °C, 16 h 振とうした後、PBS-0.1% Tween 20 (PBS-T) で洗浄した。希釈した抗 EGFR 抗体 (Cell signaling) を加え、4 °C, 16 h 反応させた。PBS-T で洗浄した後、希釈した 2 次抗体を加え、室温で 1 h 反応させた。PBS-T で洗浄した後、Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Scientific) により検出し、LAS-3000 により観察した。

#### (3) 免疫沈降

抽出したタンパク質溶液を IP RIPA buffer で希釈し、抗 EGFR 抗体 (Erbix: MERCK) を加えて 4 °C, 16 h 反応させた。洗浄済みの Pierce Protein G Magnetic Beads (Thermo Scientific) に結合させ、PBS-T で洗浄した後、0.1 M glycine (pH 2.0) を加えて 20 °C, 10 min、または SDS-PAGE sample buffer を加えて 98 °C, 10 min インキュベートすることでタンパク質を回収した。

#### (4) プロテアーゼ消化と糖ペプチド濃縮

タンパク質同定用試料は、ゲル内消化の定法に基づいて調製した。その一方で、部位特異的な糖鎖構造を推定するため、我々が独自開発した改良ゲル内消化法 1 を用いた。すなわち、精製されたタンパク質をポリアクリルアミドゲルで分離し、SimplyBlue SafeStain (invitrogen) で染色後、バンドを回収した。50% acetonitrile (ACN) を含む 25 mM ammonium bicarbonate を用いて脱色後、ACN を加えて脱水した。ACN を除去した後、減圧濃縮遠心エバポレーター (Speed Vac) を用いて、ゲル片を乾燥させた。guanidine hydrochloride (GuHCl) を含む溶液 (10 mM DTT, 25 mM ammonium bicarbonate, 0.2 M GuHCl) を加えて 56 °C, 45 min 処理した後、iodoacetamide を用いてアルキル化操作を行った。50% ACN を含む 25 mM ammonium bicarbonate を用いてよく洗浄した後、ゲル片を乾燥させた。乾燥ゲル片に trypsin 溶液 (5 µg/ml, 25 mM ammonium bicarbonate, 0.1% octyl glucoside) を加え、37 °C で 30 min 静置し、ゲル片に trypsin 溶液を染み込ませた。余分な trypsin 溶液を取り除き、25 mM ammonium bicarbonate でゲル片を覆い、37 °C で 16 h 反応させた。trypsin 消化後、抽出液 (50~10% ACN) を加え、10 min 振とうすることでペプチドを含む抽出液を回収した。この操作を繰り返し、Speed Vac を用いて濃縮した。

改良ゲル内消化と並行して、糖鎖解析用試料の調製のために、溶液消化と糖ペプチド濃縮操作を行った。糖ペプチドの濃縮は、我々が独自開発したアセトン沈殿法<sup>2</sup>を用いた。すなわち、定法に従ってプロテアーゼ消化したペプチド試料溶液に、5倍容の冷アセトンを加えて-25°Cで16hインキュベートした後、12,000×g、10min遠心することで糖ペプチドを沈殿させた。

#### (5) グリコシダーゼ消化

抽出した膜関連タンパク質溶液に変性バッファー (5% SDS, 0.4 M DTT) を加え、95°Cで5minインキュベートした。変性済みの膜関連タンパク質、および濃縮した糖ペプチドに各グリコシダーゼ反応バッファー及び酵素を添加し、37°Cで16h消化した。

#### (6) 液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS)

ゲル内消化済み試料および糖ペプチド濃縮済み試料を PepClean C-18 Spin Column (Thermo) で精製後、LC/MS に供した。LC/MS の条件は以下の通りである。

[EGFR]

HPLC:

装置: Ultimate 3000 RSLCnano LC system (Thermo Scientific)

トラップカラム: L-column2 ODS (0.3×5mm, 5 μm; CERl)

分析カラム: L-column2 ODS (0.075×150 mm, 3 μm; CERl)

溶離液 A: 0.1% formic acid/2% ACN

溶離液 B: 0.1% formic acid/90% ACN

グラジエント: 5-65% B (50 min)

流速: 0.3 μL/min

装置: EASY-nLC 1000 system (Thermo Scientific)

トラップカラム: Acclaim PepMap 100 trapping column (75 μm×2 cm, nanoViper; Thermo Scientific)

分析カラム: Nano HPLC Capillary Column (75 μm×120 mm, 3 μm, C18; Nikkyo Technos)

溶離液 A: 0.1% formic acid in water

溶離液 B: 0.1% formic acid in ACN

グラジエント: 0-45%B (55 min)

流速: 0.3 μL/min

MS:

装置: LTQ-FT (Thermo Scientific)

スプレー電圧: 1.8 kV

スキャン範囲: ペプチド; 400-2,000, 糖ペプチド; 700-2,000

分解能: 100,000 (Positive ion mode)

衝突エネルギー: 35%

装置: Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific)

イオン源: Nanospray Flex Ion Source

(Thermo Scientific)

スプレー電圧: 2.0 kV

スキャン範囲: 400-2,000

分解能: 70,000

Normalized collision energy (NCE): 27%

#### (7) 部位特異的糖鎖構造解析

タンパク質の部位特異的な糖鎖構造解析は、以下の2ステップで実施した。

脱糖鎖 (+) 試料を用いたペプチド同定 sequet によるデータベース検索により、脱糖鎖で生じた脱アミド化ペプチドを同定し、ペプチドの溶出時間および切断パターンに関する情報を得た。

脱糖鎖 (-) 試料を用いた糖ペプチド解析得られたプロダクトイオンスペクトルから、366.14 (Hex-HexNAc) を代表とする糖ペプチドの診断イオン、およびペプチドに還元末端側の GlcNAc が付加した [Peptide + GlcNAc + H]<sup>+</sup> に基づきペプチド部分を同定し、算出された糖鎖部分の精密質量から糖鎖組成を推定した。

#### 4. 研究成果

(1) 抗体医薬品を用いた免疫沈降法の確立 A431 細胞株より抽出した膜タンパク質画分を用いて、抗体医薬品セツキシマブと Protein G 磁気ビーズによる免疫沈降系を確立した (図 1A)。この系を用いて精製した EGFR のウエスタンブロットング像を図 1B に示す。170-kDa 付近に主要なシグナルが検出されたため、ポリアクリルアミドゲルで分離・染色した後、ゲル内消化法によりタンパク質を断片化し、LC-MS で解析した。データベース検索の結果、精製されたこの成分は EGFR であると同定された。

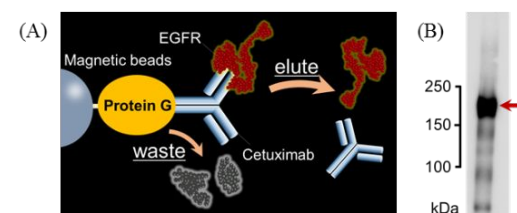


図 1. セツキシマブを用いた EGFR の精製。(A) 方法の原理。(B) 精製された EGFR の Western blot 像 (anti-EGFR antibody)

#### (2) EGFR 糖鎖構造解析

グリコシダーゼ消化により EGFR 糖鎖の構造特性を明らかにした。用いたグリコシダーゼは、主にすべての N-結合型糖鎖を切断する N-glycosidase F (PNGase F)、および高マンノース型糖鎖を切断する Endoglycosidase H (EndoH) である。抽出した膜タンパク質に対して、変性・未変性条件下で酵素消化を行い、ウエスタンブロットングで解析した。その結果、PNGase F 処理により明らかな分子量シフトが生じ、また、EndoH 消化によっても一部糖鎖の切断が認められた (図 2)。この結果は、EGFR には、複数の結合部位に N-糖鎖が付加しており、その一部に高マンノース型

糖鎖が存在することを示唆している。

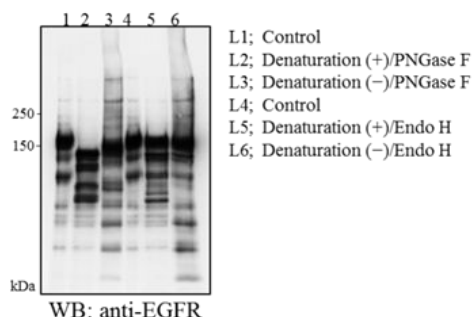


図2. グリコシダーゼ消化によるEGFR糖鎖の特性解析

詳細な部位特異的な糖鎖構造を推定するために、改良ゲル内消化法により得られたEGFR糖ペプチドをLC/MSで解析した。代表的なEGFR糖ペプチドのプロダクトイオンスペクトルを図3に示す。EGFRには、10箇所以上のN-結合型糖鎖付加部位が存在するとされている。その内、Asn352、Asn361、Asn444、Asn528、Asn603に付加する詳細な糖鎖構造を推定することができた。Asn352およびAsn361には、主に高マンノース型糖鎖、また、Asn444、Asn528、Asn603には主に複合型糖鎖の付加が認められた。この結果は、グリコシダーゼを用いた構造特性解析の結果を支持する。興味深いことに、Asn528には7-9個のGlcNAcと2-6個のFucからなる多様な糖鎖が結合していることが明らかとなった。Asn528は、EGFRのdomain 4領域に存在することから、細胞膜上の他の糖タンパク質や糖脂質との相互作用に糖鎖が関与する可能性が示唆された。

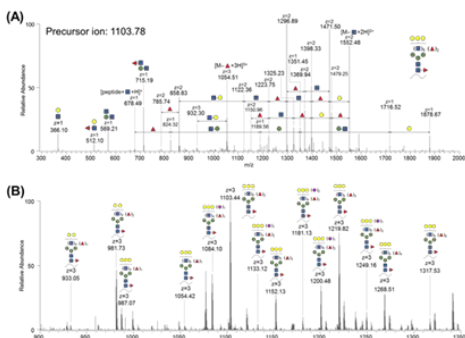


図3. EGFRの部位特異的な糖鎖構造解析。(A) Asn528を含む糖ペプチドの代表的なプロダクトイオンスペクトル。(B) Asn528を含む糖ペプチド溶出時の平均質量スペクトル

### (3) Fc Rの糖鎖解析

Fc Rの詳細な糖鎖構造を推定するために、BHK細胞由来及びヒト由来Fc $\gamma$ Rを解析した。BHK細胞由来Fc Rは、プロテアーゼ消化後LC/MSにより、また、ヒト血清由来Fc Rはプロテアーゼ消化後、糖ペプチドをアセトン沈殿法で濃縮し、LC/MSにより解析した。その結果、Fc R上に存在するすべてのN-結合型糖鎖の詳細構造を明らかにすることができた。また、ある特定の結合部位に結合している糖鎖の不均一性が高くなっていることが明らかになった<sup>3, 4</sup>。

本研究の成果により、細胞膜上受容体を含む抗体医薬品の標的分子の詳細な部位特異的な糖鎖構造解析が可能になった。糖鎖が異なる標的分子の存在が示唆される結果も得られており、今後、これらの分子の解析を進めることで、抗体医薬品の個別化医療推進に貢献できると期待される。

### [引用文献]

Takakura et al. Proteomics (2014)  
Takakura et al. Journal of Proteomics (2014)  
Kawasaki et al. Journal of Glycomics & Lipidomics (2014)  
論文作成中

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

Ohmi Y, Ise W, Harazono A, Fukuyama H, Baba Y, Narazaki M, Shoda H, Takahashi N, Ohkawa Y, Shutting J, Sugiyama F, Fujio K, Kumanogoh A, Yamamoto K, Kawasaki N, Kurosaki T, Takahashi Y, Furukawa K. Sialylation converts anti-citrullinated protein/peptide IgG antibodies into effective inhibitors of murine arthritis. Nat Commun. 査読有, 2016, 7:11205, doi: 10.1038/ncomms11205  
Takakura D, Tada M, Kawasaki N, Membrane glycoproteomics of fetal lung fibroblasts using LC/MS, 査読有, Proteomics, 2016, 16, 47-59 doi: 10.1002/pmic.201500003  
Kawasaki N, Okumoto T, Yamaguchi Y, Takahashi N, Fridman WH, Sautès-Fridman C, Yagi H, Kato K. Site-Specific Classification of N-Linked Oligosaccharides of the Extracellular Regions of Fc Receptor IIIb Expressed in Baby Hamster Kidney Cells. J. Glycomics Lipidomics, 査読有, 2014, 4(2), 1000116  
doi: 10.4172/2153-0637.1000116

[学会発表](計 12件)

吉田晴香、高倉大輔、川崎ナナ：乳がん細胞膜糖タンパク質の部位特異的なN-型糖鎖変化。第39回日本分子生物学会年会 日本分子生物学会年会(2016. 11. 30-12. 2) パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)  
川崎ナナ：質量分析による生体糖タンパク質解析のフロンティア。第64回質量分析総合討論会(2016. 5. 18~20) ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市)

高倉大輔, 川崎ナナ: 膜グライコミクス  
技術の確立. 第 34 回日本糖質学会年会  
(2015. 7.31-8.2)東京大学安田講堂(東  
京都文京区)

川崎ナナ, 高倉大輔: 糖タンパク質分析  
技術の開発. 日本プロテオーム学会 2015  
年会 (2015. 7. 23, 24) くまもと森都  
心プラザ(熊本県・熊本市)

〔図書〕(計 3 件)

川崎ナナ: “日本薬局方技術情報 2016  
(JPTI 2016)”, 一般試験法「糖鎖試験法」.  
(一財)医薬品医療機器レギュラトリーサ  
イエンス財団 編. 株式会社じほう, 東  
京 (2016), pp. 177-182

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川崎 ナナ (KAWASAKI Nana)  
横浜市立大学・生命医科学研究科・教授  
研究者番号: 20186167

### (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・室長  
研究者番号: 50506954

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

小川 久美子 (OGAWA Kumiko)  
国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物  
試験研究センター病理部・部長  
研究者番号: 70254282