

平成30年6月6日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18884

研究課題名(和文) 抗体医薬品の有害作用発現に関連するヒト免疫応答メカニズムの解析

研究課題名(英文) Mechanisms of the immune responses related to adverse reactions of therapeutic mAbs

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗体医薬品投与時の有害作用発現に関与しうる、抗体医薬品及びその分子変化体・不純物等に対するヒト免疫応答を明らかにすることを目的に研究を行い、改変型抗体のFc領域を介した免疫細胞活性化に伴うサイトカイン・ケモカイン放出、宿主細胞由来タンパク質に対するヒト血清反応性、抗体医薬品凝集体の特性とFc受容体活性化能の関連について明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to analyze immune-related reactions against therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) or their variants including impurities, which may induce adverse reactions. We revealed the cytokine- and chemokine-release profiles induced by Fc-engineered mAbs, the recognition of host-cell proteins by pre-existing antibodies in human serum, and the relationship between the characteristic of mAbs aggregates and the activation of Fc gamma receptors.

研究分野：レギュラトリーサイエンス

キーワード：抗体医薬品 Fc 受容体

1. 研究開始当初の背景

近年開発の進展の著しい抗体医薬品は炎症性疾患や悪性腫瘍など、これまでの化学薬品では困難であった様々な疾患の治療に大きく貢献している。抗体医薬品は抗原との特異的な相互作用により薬理作用を発揮することから、一般に、標的抗原を発現しない細胞・組織への作用及びそれに伴う有害作用の発現は低いとされている。一方で、抗体医薬品投与時に懸念される共通の有害作用として、インフュージョン反応や抗薬物抗体の出現といった免疫系の関与する応答が知られている。遺伝子組換えによって哺乳動物細胞等を用いて製造される抗体医薬品には、多くの分子変化体（糖鎖等の翻訳後修飾の差異、凝集体など）や発現細胞由来のタンパク質（宿主細胞由来タンパク質：HCP）が混在しており、これらもヒトに投与された際に意図せぬ免疫応答を惹起する要因であると考えられている。しかしながら、このような抗体医薬品あるいは抗体医薬品に含まれる不純物の有害作用の発現に関与するヒト免疫応答の詳細については未解明な点が多く存在する。

2. 研究の目的

本研究では種々の免疫細胞に発現し抗体Fc領域を介した免疫応答に密接に関与するFc γ 受容体の活性化を中心に、種々の抗体医薬品とその分子変化体・不純物等に対するヒト免疫細胞の応答性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Fc領域改変型抗体によるヒト免疫細胞活性化の評価

Fc領域改変型抗CD20抗体の作製

抗CD20抗体リツキシマブの重鎖・軽鎖可変領域をコードするDNA断片を人工遺伝子合成し、ヒトIgG1発現ベクター（pFUSE-CHIg、pFUSE2-CLIg-hk）にサブクローニングした。Fc領域改変型抗体発現ベクターは重鎖可変領域をpFUSE-CHIg-hG4、pFUSE-CHIg-hG1e3、pFUSE-CHIg-hG1e5、pFUSE-CHIg-hG1e7ベクターにサブクローニングすることにより作製した。重鎖及び軽鎖発現ベクターをCHO-S細胞にトランスフェクションし、7日間培養後、培養上清を回収し、Protein Gカラムを用いて抗体を精製した。

Fc γ 受容体活性化能の測定

改変型抗体によるFc γ 受容体活性化の評価には、独自に樹立したFc γ 受容体発現レポーター細胞株（Jurkat/Fc γ RIIa/NFAT-Luc、Jurkat/Fc γ RIIIa/NFAT-Luc）を使用した。

標的細胞存在下でのFc γ 受容体活性化の評

価では、CD20を発現する標的細胞（Daudi）とレポーター細胞（E/T ratio = 10 : 1）を各抗体存在下で5時間共培養し、ONE-Glo Luciferase Assay System（Promega）を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

標的細胞を用いない測定では、96穴アッセイプレートにProtein L溶液（1 μ g/well）を加えて一晩静置し、Protein L固相化プレートを作製した。ここにレポーター細胞及び各抗体を添加し、上と同様の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。

ヒト末梢血単核球(hPBMC)活性化に伴うサイトカイン・ケモカイン分泌の測定

凍結hPBMC（CTL社）は試験の直前に解凍しCTL-Test Mediumに懸濁した。と同様の方法で作製したProtein L固相化プレートに、hPBMC（1.25 \times 10⁵ cells/well）及び各抗体（0.03 μ g/well）を添加し、24時間培養後、培養上清を回収した。

サイトカイン・ケモカインの分泌プロファイルの比較には抗体アレイ（Human Inflammation Array C3 Kit, RayBiotech）を使用した。ImageQuant LAS4000（GE Healthcare）を用いて画像の取得を行い、スポットの解析はImageQuant TL software（GE Healthcare）で実施した。

分泌されるサイトカイン・ケモカインの定量にはBD Cytometric Beads Array（BD Bioscience）を使用した。データの取得はフローサイトメーターFACSCanto IIで行い、解析にはFCAP Array v3.0 softwareを使用した。

(2) CHO-HCPに対するヒト血清反応性の評価

CHO-S細胞を無血清培地を用いて7日間培養した培養上清を試料(CHO-HCP)とした。CHO-HCPをELISA用プレートに固相化した後、正常ヒト血清を添加し、抗ヒトIgG抗体を用いて、CHO-HCPに対する反応の有無を測定した。

(3) 抗体医薬品凝集体によるFc γ 受容体活性化の評価

抗体医薬品凝集体の作製

既承認の抗体医薬品製剤を試料とし、攪拌処理により凝集体の形成を誘導した。形成された凝集体の量及び分子サイズはAggregates Sizer（島津）を用いたレーザー回折散乱法により評価した。

Fc γ 受容体活性化能の測定

Fc γ 受容体発現レポーター細胞株に抗体医薬品凝集体を添加し、(1)と同様の方法でルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) Fc 領域改変型抗体によるヒト免疫細胞活性化の評価

Fc 領域の構造の異なる改変型抗体による免疫細胞活性化について評価するため、抗 CD20 抗体リツキシマブの Fc 領域改変型抗体を作製した (図 1)。

IgGサブクラス置換体	
IgG1	hIgG1 (IgG1)
IgG4	hIgG4 (IgG4)
Fc領域アミノ酸配列改変体	
IgG1e3	hIgG1(E233P/L234V/L235A/ΔG236+A327G/A330S/P331S)
IgG1e5	hIgG1(S239D/A330L/I332E)
IgG1e9	hIgG1(G236A/S239D/I332E)

図 1 Fc 領域改変型抗体

Fcγ 受容体発現レポーター細胞株を用いて、作製した改変型抗体の Fcγ 受容体活性化能を評価した結果、標的細胞 (Daudi) を用いた系、及び、Protein L 固相化プレートを用いた系のどちらにおいても、Fc 領域の改変により意図した Fcγ 受容体活性化能の変化が生じていることを明らかにした (図 2)。

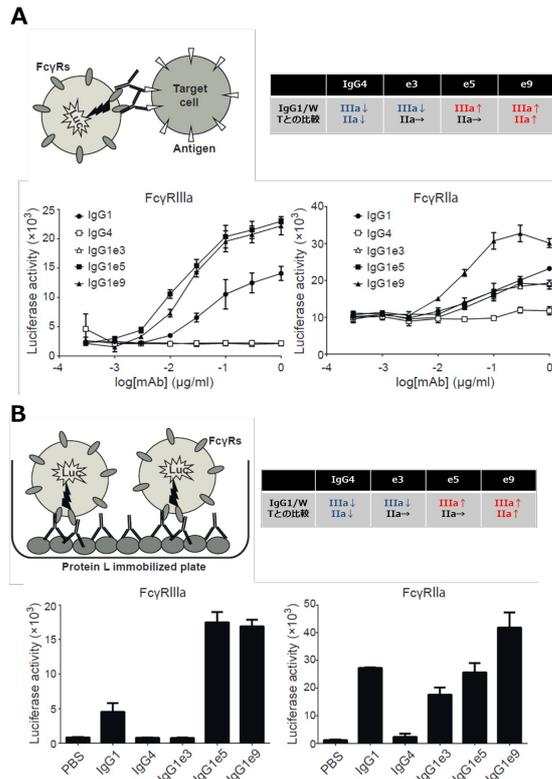


図 2 Fc 改変型抗体の Fcγ 受容体活性化能 (A) 標的細胞 (Daudi 細胞) 存在下 (B) Protein L 固相化法

次に、Fc 領域改変型抗体によるヒト免疫細胞の活性化を評価する目的で、抗体 Fc 領域を介した hPBMC の活性化に伴うサイトカイン・ケモカイン放出について検討を行った。標的細胞を用いる系では標的細胞の活性化・細胞死等に伴う影響を排除できないため、Protein L 固相化法を用いて改変型抗体によるサイトカイン・ケモカインの分泌誘導を評価した結果、特に FcγRIIIa 活性化能の増強された改変型抗体 IgG1e5 及び IgG1e9 によって、炎症性サイトカイン及びケモカインの分泌が亢進することが明らかとなった (図 3)。

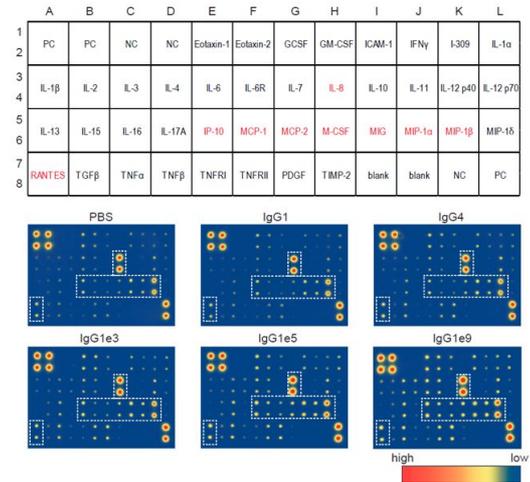


図 3 抗体アレイを用いたサイトカイン・ケモカイン分泌プロファイルの比較

さらに、より詳細な比較を行うため、hPBMC 培養上清中に分泌された IFNγ、IL-1β、TNFα、IP-10、MCP-1 の量を定量した結果、改変型抗体 IgG1e5 及び IgG1e9 では野生型 IgG1 に比べてこれら炎症性サイトカイン・ケモカインの分泌が有意に亢進することを明らかにした (図 4)。

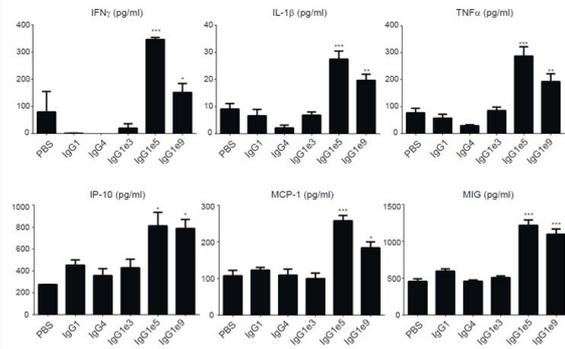


図 4 改変型抗体による炎症性サイトカイン・ケモカインの分泌亢進

IgG1e5 及び IgG1e9 は共に野生型 IgG1 と比べて高い FcγRIIIa 活性化能を有しており、抗体 Fc 領域を介した hPBMC の活性化においては FcγRIIIa が主要な役割を果たす可能性が考えられた。また、ADCC 活性において主要な役割を果たす NK 細胞等から分泌される IFN に加えて、単球系細胞から分泌される種々の炎症性サイトカインおよびケモカインの分泌の亢進が認められたことから、これらの改変型抗体では NK 細胞のみならず単球系細胞の活性化が生じることが示唆された。これらが抗体医薬品投与時のインフュージョン反応等の有害作用発現に関連する可能性については今後の検討が必要である。

(2) CHO-HCP に対するヒト血清反応性の評価

正常ヒト血清 (30 ドナー分) を用いて、抗体医薬品産生細胞として用いられる CHO 細胞の培養上清に含まれるタンパク質 (HCP) に対する反応性を評価した結果、特定のドナー由来の血清が HCP に対して顕著な反応を示すことを明らかにした。HCP 反応性の認められた血清を固相化した抗体カラムを用いて、当該血清により認識されるタンパク質を精製し、反応の特異性を確認した。これらの結果から、ヒト血清中には CHO 細胞由来の HCP を認識する pre-existing antibody が存在していることが明らかとなった。pre-existing antibody に認識される HCP が抗体医薬品製剤中に残存した際には特に有害作用発現を惹起するリスクが高いと考えられ、これらの管理の重要性が示唆された。

(3) 抗体医薬品凝集体による Fcγ 受容体活性化の評価

Fc 領域の構造の異なる複数種類の抗体医薬品を強制劣化処理して誘導した subvisible 領域の凝集体を試料として、抗体医薬品による免疫細胞活性化と密接に関与する Fcγ 受容体の活性化について検討を行った。レーザー回折散乱法により試料中の subvisible particle の形成を確認した後、独自に開発した Fcγ 受容体発現レポーター細胞に添加した際の Fcγ 受容体の活性化を測定した結果、抗体 Fc 領域の構造の違いにより、凝集体により活性化される Fcγ 受容体の種類及び活性化強度が異なることが明らかとなった。

以上の結果は、凝集体による免疫細胞の活性化、及び、これに起因する有害作用発現のリスクは IgG サブクラス等の抗体の構造や凝集体の特性によって異なることを示唆するものであり、これらを考慮した凝集体の品質管理戦略の構築が必要であると考えられた。

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 1 件)

Takakura M, Tada M, Ishii-Watabe A. Development of cell-based assay for predictively evaluating the FcγR-mediated human immune cell activation by therapeutic monoclonal antibodies. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 2017. 25;485(1):189-194. doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.050.

[学会発表](計 1 件)

多田稔、石井明子. 抗体医薬品凝集体による免疫細胞活性化. 第 17 回日本蛋白質科学会年会. 2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究協力者

青山 道彦 (AOYAMA, Michihiko)
国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・研究員