

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18973

研究課題名(和文)FcRLの分子認識機構に着目したリガンド抗体分子探索と機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of FcRL molecule based on molecular recognition mechanism

研究代表者

木吉 真人(Kiyoshi, Masato)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・研究員

研究者番号：60754314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、Fc receptor-Like Protein (FcRL)を介した生体応答と抗体医薬品の有効性・安全性の関連を明らかにし、抗体医薬品の分子設計や品質評価・管理に活用するため、FcRLの分子認識機構に着目したリガンド探索と機能解析を行うことである。Surface Plasmon Resonance (SPR)法を用いて、FcRL1, FcRL2, FcRL3, FcRL5, FcRLBの5つのサブタイプに対する抗体医薬品との結合特性解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the relationship between the biological response mediated by Fc receptor-like protein (FcRL) and the efficacy / safety of antibody drugs, and to utilize it for molecular design and quality evaluation and management of antibody drugs. Moreover, this study focuses on the molecular recognition mechanism of FcRL to its ligands and perform functional analysis. We analyzed the binding properties of antibody subtype to five subtypes FcRL1, FcRL2, FcRL3, FcRL5 and FcRLB using Surface Plasmon Resonance (SPR) method.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：FcRL IgG リガンド 安定性

1. 研究開始当初の背景

Fc 受容体(classical FcR)ファミリーは、主な免疫応答を担う Fc R や、抗体の体内動態制御に関わる FcRn などが知られている。近年、新たな Fc 受容体のファミリー蛋白質として Receptor-like protein(FcRL)が同定された¹⁾。IgG に高親和性を示す Fc RI とアミノ酸配列相同性が高いことから、IgG に結合する Fc 受容体ホモログとしての機能が考えられている。ゲノムシーケンス解析から、B 細胞上に発現する FcRL1,2,3,4,5,6 と、細胞質に存在する FcRLA,B に分類される。

FcRL はリガンドとして IgG に結合することが示唆されている。しかし、各サブタイプの FcRL がそれぞれどのアイソタイプの IgG に結合するのか、リガンドの詳細な同定はなされていない。投与された抗体医薬品が FcRL に結合するのであれば、抗体医薬品の体内動態等に著しい影響を及ぼすと考えられる。さらに、結合によって B 細胞を介した免疫応答を引き起こるのであれば、抗体医薬品の有効性、安全性への影響は非常に大きいと考えられる。

また、先行研究において、FcRL5 は凝集体を形成した IgG への結合を示唆するデータが得られている。しかし、凝集体の粒子サイズや、凝集体の性質の違いと、FcRL5 への親和性との相関について詳細に調べた研究はない。抗体医薬品の凝集性が、抗薬物抗体産生を惹起し、薬物動態、薬理作用、副作用に大きく影響を与える可能性があり、喫緊の課題となっている。

これら FcRL の機能に関する知見は圧倒的に不足している。一般的な classical FcR は、リガンドの結合に付随するシグナルを下流へと伝達するための細胞内ドメインとして Immunoreceptor Tyrosine-based Activating (Inhibitory) Motif (ITAM or ITIM)を持つ。'classical' Fc 受容体は ITAM または ITIM のどちらかを 1 つ持つが、FcRL はこのドメインを複数持ち、さらに FcRL2、3、5 は ITAM と ITIM の両者を併せ持つことが知られている。つまり FcRL は免疫反応を活性化、もしくは抑制の両方(dual-modulation)を使い分けられていると考えられる。しかし、各サブタイプの FcR が発するシグナルがどのような作用を持つのか、またその詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

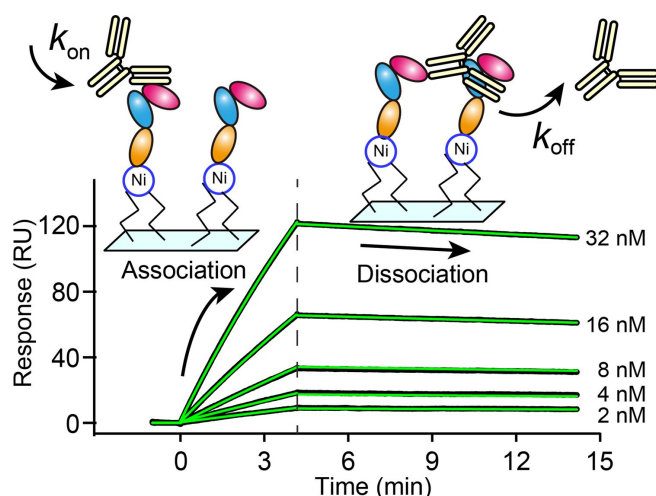
Fc Receptor-like protein (FcRL)は、主として B 細胞に発現し、免疫グロブリン(Ig)と結合する受容体タンパク質である。FcRL には FcRL-1,2,3,4,5,6,A,B のサブタイプが存在し、抗原提示、B 細胞の分化、抗原抗体複合体(Immune Complex)の保持などへの関与が示唆されており、免疫学的観点から注目されている。IgG 構造を持つ抗体医薬品は、FcRL に結合して免疫応答を惹起する可能性が考えられるが、各 FcRL サブタイプの IgG(リガンド)結合特異性、即ち、どのサブタイプの FcRL がどのサブクラスの IgG に結合するかは解明されておらず、FcRL との結合によって、抗体医薬品の有効性、安全性がどのように影響を受けるかについての知見は不足している。

本研究の目的は、FcRL を介した生体応答と抗体医薬品の有効性・安全性の関連を明らかにし、抗体医薬品の分子設計や品質評価・管理に活用するため、Fc receptor-Like Protein (FcRL)の分子認識機構に着目したリガンド探索と機能解析を行うことである。

3. 研究の方法

各 FcRL サブタイプと IgG との親和性解析に関しては、各サブクラスの FcRL 蛋白質を調製し、種々の抗体医薬品との親和性の解析を行った。また、DSF を用いて、FcRL タンパク質の熱安定性を測定した。

4. 研究成果



Fc receptor-Like Protein (FcRL) を介した生体応答と抗体医薬品の有効性・安全性の関連を明らかにし、抗体医薬品の分子設計や品質評価・管理に活用するため、FcRL の分子認識機構に着目したリガンド探索と機能解析を行うことである。Surface Plasmon Resonance (SPR) 法を用いて、FcRL1、FcRL2、FcRL3、FcRL5、FcRLB の 5 つのサブタイプに対する抗体医薬品との結合特性解析を行った。Ni、HisTag を介して、NTA センサーチップへの FcRL の固定化を行ったが、IgG の結合は確認できなかった。

さらに、抗 HisTag 抗体を介して、

CM5 センサーチップへの His キャプチャー法を用いた固定化を行ったが、IgG の結合は見られなかった。ピアコアの結合シグナルが非常に弱く、IgG が FcRL に結合していないのか、もしくは FcRL のセンサーチップへの固定化によって、蛋白質の物性が変化したのか、について検討を行った。Differential Scanning Fluorimetry (DSF)を用いて FcRL の安定性を評価した。その結果、FcRL は、どのサブタイプも熱安定性が低いことが明らかとなった。特に、FcRL1, FcRL3, FcRL5 は非常に安定性が低く、溶液中で不安定であることが明らかとなった。すなわち、FcRL と、そのリガンドである IgG との親和性を定量する手法は未だ改善の余地がある。

これらの結果から、FcRL 分子は、細胞表面上で糖鎖や、周辺の脂質分子、タンパク質と共同的に働いており、FcRL 単独では、溶液中で安定性が低いのではないかと考えられる。

今後は、熱安定性の比較的高かった FcRL サブタイプに焦点を当て、リコンビナントタンパク質の作製を目指す。大腸菌、カイコ、酵母、CHO 細胞など、種々の発現細胞の検討を行い、タンパク質の大量発現系を構築する。DSC を用いて、詳細な安定性評価を行った後、二次構造解析、リガンド解析などを行う。これにより、リガンド特異性と親和性、体内での機能を解析する足掛かりとなる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 研究員 木吉 真人 (KIYOSHI MASATO)

研究者番号：60754314

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()