

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06812

研究課題名（和文）Fc RIIbを介する抗体医薬品の薬理作用・薬物動態制御機構の解明

研究課題名（英文）Research on regulatory mechanisms of pharmacodynamics and pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies via Fc gamma receptor IIb

研究代表者

石井 明子（Ishii-Watabe, Akiko）

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・部長

研究者番号：50291117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：近年の抗体医薬品開発動向から、新たに注目すべき分子として、抗体による免疫細胞活性化に抑制的に働く受容体であると同時に、抗体の体内動態制御や抗原抗体複合体のクリアランスに関わるとされるFc受容体（Fc RIIb）に着目した研究を行った。Fc RIIbおよび活性化型受容体であるFc RIIIaを共発現したレポーター細胞を構築して、Fc領域改変型抗体の設計・評価において重要とされるIIb/IIIa活性化比の評価に有用である可能性を示した。また、Fc RIIbを発現するヒト肝類洞内皮細胞由来細胞株を構築し、抗体薬物複合体の分子変化体の取り込みや毒性に、Fc RIIbが関与する可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトFc受容体ファミリーの中で唯一の抑制性受容体であるFc RIIbが関与する抗体医薬品の薬理作用や細胞内取り込み等の評価に活用できる細胞株を構築し、その有用性を示した。樹立した細胞株は、抗体医薬品の有効性・安全性に関わる機序解明のための研究に役立てることができ、学術的な貢献が期待できる。加えて、構築した細胞は、Fc領域を改変した抗体医薬品の分子設計においても有用であり、次世代抗体医薬品の開発の際にも活用可能であることから、社会的意義も十分と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Based on the recent trends in development of therapeutic antibodies, we performed the study focusing on Fc receptor (Fc RIIb). The Fc RIIb is an inhibitory receptor that suppresses activation of immune cells by antibodies, and also involved in regulation of pharmacokinetics of antibodies and clearance of antigen-antibody complex. We constructed Fc RIIb and Fc RIIIa co-expressing reporter cells, and showed that the cells are useful for evaluating the Fc RIIb/IIIa activation ratio, which is important in molecular design and evaluation of Fc-modified antibodies. We also constructed a Fc RIIb expressing cell line derived from human hepatic sinusoidal endothelial cells, and suggested that Fc RIIb may be involved in the uptake and toxicity of molecular variants of antibody-drug conjugates.

研究分野：バイオ医薬品の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 Fc RIIb 薬理作用 体内動態

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

秀逸な分子進化を遂げた抗体（IgG）骨格を利用して創出される抗体医薬品は、悪性腫瘍や関節リウマチ等の治療薬として不可欠な存在となり、研究開始当初、本邦でも既に40品目以上が上市されていた。その後も抗体医薬品の開発品目は増加し、2022年において本邦で承認されている抗体医薬品は80品目を超えており、この間に倍増している。抗体医薬品の薬効発現において、抗原との結合が重要であることは言うまでもないが、抗体医薬品の有効性・安全性には、FcドメインとFc受容体との結合による免疫細胞の活性化や体内動態の制御が、極めて重要な役割を果たしており、抗体医薬品の品質・有効性・安全性の確保には、Fc受容体を介した生体応答に関する最新の知見の活用が必要となっている。

2. 研究の目的

本研究では、新たに注目すべき分子として、抗体による免疫細胞活性化に抑制的に働く受容体であると同時に、抗体の体内動態制御や抗原抗体複合体のクリアランスに関わるとされるFc受容体（FcγRIIb）に着目し、FcγRIIbが介在する抗体医薬品の薬理作用・体内動態制御評価に関する研究を実施した。

3. 研究の方法

（1）FcγRIIb発現レポーター細胞株の樹立

カルシウムシグナル応答性のレポーター遺伝子（NFAT-Luc）を安定発現するJurkat細胞（Jurkat/NFAT-Luc）を親株として作製したFcγRIIbを単独発現、あるいは、FcγRIIbとFcγRIIIaを共発現する細胞株（先行研究で作製済みのプール細胞）を出発材料として使用した。これらの細胞株を限界希釈法によりシングルクローン化し、蛍光標識抗CD32抗体、抗CD16抗体を用いたフローサイトメトリーによるFcγ受容体の発現量の評価、及び、カルシウムイオノフォア（A23187）刺激によるレポーター活性の評価を行い、細胞株を選別した。

（2）FcγRIIb活性化の評価

樹立したFcγRIIb単独、あるいは、FcγRIIb/FcγRIIIa共発現レポーター細胞株とヒトバーキットリンパ腫由来の細胞株であるRaji細胞（JCRB9012）を、抗CD20抗体リツキシマブ存在下で共培養し、抗原結合に依存したFcγ受容体の活性化をルシフェラーゼ活性を指標に測定した。

（3）FcγRIIb発現TMNK-1細胞株の樹立

不死化ヒト肝内皮細胞株であるTMNK-1（JCRB1564）にリポフェクション法によりFcγRIIb発現プラスミドを遺伝子導入し、ピューロマイシン存在下で培養して安定発現細胞株を選別した。増殖したコロニーをピックアップして拡大培養した後、蛍光標識抗CD32抗体を用いたフローサイトメトリーによりFcγRIIbの発現を確認した。

（4）抗体薬物複合体の細胞内取り込みに伴う細胞毒性の評価

HER2を標的とする抗体医薬品トラスツズマブ（ハーセプチン®）、抗体薬物複合体トラスツズマブ

ブ エムタンシン (カドサイラ®), トラスツズマブ デルクステカン (エンハーツ®) を試料として用いた。また, 比較対象として強制劣化処理を施した試料を調製した。TMNK-1 細胞, 及び, FcγRIIb を安定発現する TMNK-1 細胞に試料を添加して 3 日間培養した後, WST-8 アッセイによって細胞毒性を評価した。

4. 研究成果

(1) 抗体医薬品による FcγRIIb 活性化の評価

抗体医薬品による FcγRIIb の活性化を評価するため, FcγRIIb を単独発現, あるいは, それに加えて活性化型受容体である FcγRIIIa を共発現するレポーター細胞株を複数クローン樹立した。抑制性受容体である FcγRIIb の活性化を直接測定することは困難であったものの, 共発現する FcγRIIIa の活性化に対する FcγRIIb の抑制効果を指標とすることで, ADCC 活性の増強を目的とした Fc 領域改変型抗体の設計・評価において重要とされる I Ib/IIIa 活性化比の評価に有用である可能性が示された。

(2) FcγRIIb を介した抗体医薬品の細胞内取り込みの評価

抗体医薬品の体内動態制御における FcγRIIb の関与について検討するため, 抗体医薬品のクリアランスに関与することが知られている肝類洞内皮細胞に着目した。細胞バンクより入手可能な細胞株である TMNK-1, SK-HEP-1, 及び, 購入可能な不死化細胞株 (Applied Biological Materials 社) について, 内在性 FcγRIIb の発現をフローサイトメトリーにより評価した結果, 何れの細胞株においても発現は認められなかった。そこで, TMNK-1 細胞に遺伝子導入を行い, FcγRIIb を安定発現する細胞株を複数クローン樹立した。

抗体の細胞内取り込みへの FcγRIIb の寄与を評価するため, 抗体薬物複合体の取り込みに伴う細胞毒性を指標とした検討を行った。トラスツズマブ エムタンシン (カドサイラ®), トラスツズマブ デルクステカン (エンハーツ®) は HER2 を標的とする抗体薬物複合体であり, HER2 を発現する癌細胞に取り込まれることで抗腫瘍活性を発揮する。本実験では HER2 を発現しない非標的細胞である TMNK-1 細胞を用いてオフターゲット毒性を評価した。野生型 TMNK-1 に試料を添加して培養した結果, 薬物を搭載していないトラスツズマブでは細胞毒性は認められないのに対し, トラスツズマブ エムタンシン, 及び, トラスツズマブ デルクステカンによるオフターゲット細胞毒性が観察された (図 1)。また, 強制劣化処理を施した試料ではこれらのオフターゲット毒性の増強が認められた。FcγRIIb を発現する TMNK-1 細胞では, 未処理のトラスツズマブ エムタンシン, 及び, トラスツズマブ デルクステカンによるオフターゲット細胞毒性は野生型 TMNK-1 細胞と同程度に観察された一方で, FcγRIIb の発現により強制劣化処理試料による細胞毒性が増強することが明らかとなった。

以上の結果から, 強制劣化処理試料に含まれる抗体薬物複合体の分子変化体がオフターゲット毒性の増強に関与すること, 及び, FcγRIIb が当該分子変化体の細胞内取り込みに関与することが示唆された。

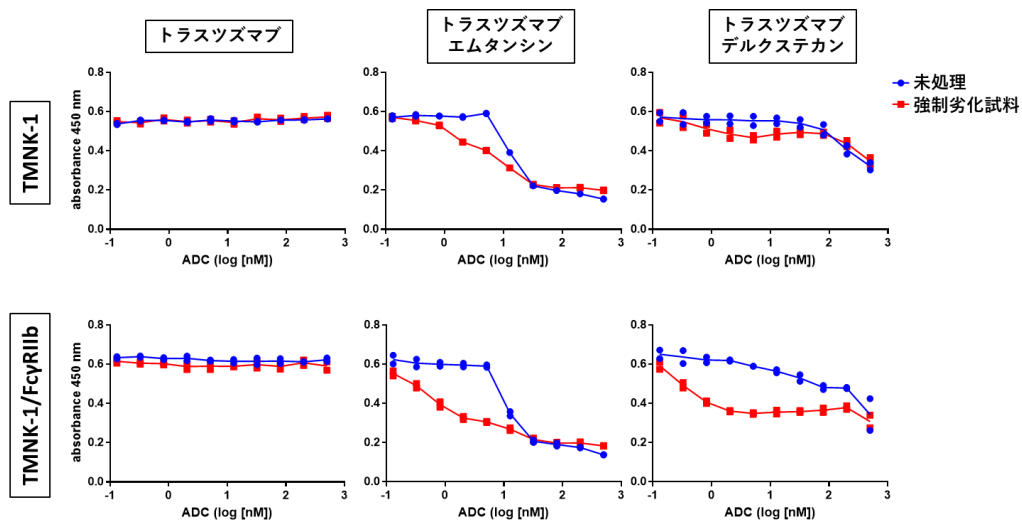


図 1 FcyRIIb 発現 TMNK-1 細胞における抗体薬物複合体の細胞傷害活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井明子
2. 発表標題 多機能バイオリジクスの開発推進に向けたレギュラトリーサイエンスに関する現状と今後の展望
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井明子
2. 発表標題 バイオ医薬品の創薬に関わるレギュラトリーサイエンス
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 青山道彦, 多田稔	4. 発行年 2020年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 9
3. 書名 有効性・安全性確保のためのバイオ医薬品の品質管理戦略 第2版 クオリティ・バイ・デザインを取り入れた製造・品質管理 第7章 品質管理戦略の構築と臨床・非臨床試験 薬理作用と品質特性	

1. 著者名 鈴木琢雄, 石井明子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 じほう	5. 総ページ数 15
3. 書名 有効性・安全性確保のためのバイオ医薬品の品質管理戦略 第2版 クオリティ・バイ・デザインを取り入れた製造・品質管理 第7章 品質管理戦略の構築と臨床・非臨床試験 薬物動態と品質特性	

1. 著者名 石井明子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 エル・アイ・シー, 東京	5. 総ページ数 12
3. 書名 バイオリジクスの開発と品質・安全性確保(下) 第2部 第1章 概論 抗体医薬品の現状と課題	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	多田 稔 (Tada Minoru) (50506954)	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・室長 (82601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	青山 道彦 (Aoyama Michihiko) (40803937)	国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・研究員 (82601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関