

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390144

研究課題名(和文)抗体医薬品によるインフュージョン反応の発現メカニズム解析と予測系の構築

研究課題名(英文)Mechanistic analysis and prediction of infusion reactions

研究代表者

斎藤 嘉朗(Saito, Yoshiro)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・部長

研究者番号：50215571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：インフュージョン(IF)反応はヒトへの初回投与時から発現するため、前臨床段階での予測が重要である。本研究では、1) IF反応を起こしやすい抗体医薬品の調査、2) セツキシマブ投与患者ゲノムDNAを対象にした、IF反応惹起に関与すると考えられるFCGR1A, FCGR2A, FCGR3Aの遺伝子多型解析、3) Fc 受容体のうち、FCGR2AがコードするFc R11aに見いだされた新規遺伝子多型(L273P)が受容体機能に及ぼす影響の検討、4) IF反応予測のためのヒト末梢血単核細胞を用いるIn vitroアッセイ系の構築、を行った。

研究成果の概要(英文)：Infusion reaction (IF) is a severe adverse reaction often caused by therapeutic antibodies and occurs at the first time of infusing the antibodies. The mechanistic analysis and prediction of IF in the pre-clinical stage is important for preventing patients from IF in the clinical stage. The results of this study was follows: 1) List of suspected drugs for IF by Japanese Adverse Drug Event Report database. 2) Analysis of FCGR1A, FCGR2A, FCGR3A genes to screen genetic polymorphisms using genomic DNAs from cetuximab-administered patients. 3) Functional analysis of a novel genetic polymorphism 818T>C (L273P) found in FCGR2A gene encoding FcγRIIa. 4) Development of in vitro assay system for assessing causability of IF using human peripheral blood mononuclear cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学 応用薬理学

キーワード：抗体医薬品 副作用

### 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品は比較的成功確率が高いことから、製薬メーカーが開発にしのぎを削っており、承認される抗体医薬品の数も飛躍的に増加している。近年、主流の抗体は、可変領域のみマウス抗体由来の配列を有し定常領域はヒトの配列を有するキメラ抗体(ヒト割合 66%)、L鎖及びH鎖可変領域中の計6カ所の抗原認識部位(相補性決定領域)のみマウス由来であるヒト化抗体(同 90%)、全領域でヒトの体内で産生されるものと同じ配列を有する完全ヒト抗体(同 100%)、のいずれかである。従って、前臨床で使用する動物に投与しても異物として扱われ、連続投与により抗体医薬品に対する抗体が産生されるなど、投与動物データのヒトへの外挿は化学医薬品より困難な面がある。特に免疫系が関与する毒性に関しては、予測が難しいとされる。

その顕著な例として挙げられるのが、2006年に英国で発生した TGN1412 事件である。本事件は、フェーズ1として抗 CD28 ヒト化抗体である TGN1412 を投与された6名の被験者全員が、投与直後から全身の痛みや強い吐き気、呼吸困難を訴え、集中治療室に搬送されたものである。心肺サポート等の治療により、最終的には全員回復した。原因は抗体医薬品を投与した際に、初回投与時から発現する副作用であるインフュージョン(IF)反応の一種、サイトカイン放出症候群とされた。前臨床で用いられたサルでは一部 IL-5 や IL-6 の上昇は認められたものの、ヒトで発現したような重篤な症状は見られなかったことから、前臨床段階の知見では、重篤な副作用の予測は困難であった。

### 2. 研究の目的

IF 反応はヒトへの初回投与時から発現するため、前臨床段階での予測が重要である。本研究は、1) 副作用自発報告の公開データベースを利用した IF 反応を起こしやすい抗体医薬品の調査、2) セツキシマブ投与患者ゲノム DNA を対象にした、IF 反応惹起に考えると考えられる *FCGR1A*, *FCGR2A*, *FCGR3A* の遺伝子多型解析、3) Fcγ 受容体のうち、*FCGR2A* がコードする FcγRIIa に見いだされた新規遺伝子多型(L273P)が受容体機能に及ぼす影響の検討、4) IF 反応予測のための、ヒト末梢血単核細胞を利用した、複数のサイトカインを同時測定する *in vitro* アッセイ系の構築、を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) IF 反応に関する疫学調査

医薬品医療機器総合機構のホームページ ([http://www.info.pmda.go.jp/fsearchnew/jsp/menu\\_fukusayou\\_base.jsp](http://www.info.pmda.go.jp/fsearchnew/jsp/menu_fukusayou_base.jsp)) 上で公開されている「副作用が疑われる症例報告ラインリスト」を対象に調査を行った。検索用語と

しては、IF 反応である「注入に伴う反応」を用い、医療機関報告数と企業報告数を合算した総報告件数を、年度毎に(2013年度については12月まで)集計した。

#### (2) セツキシマブ投与患者試料の収集と遺伝子解析

臨床試料は、国立がん研究センター及び国立医薬品食品衛生研究所の倫理審査委員会での承認後、国立がん研究センターにて、セツキシマブ投与患者に対する文書による説明・同意を得て、末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。

*FCGR1A* は相同性の高い(99.6%)偽遺伝子および相同遺伝子が存在するため、特異的に *FCGR1A* を増幅する PCR プライマーの設計が困難であったが、検討を重ね、遺伝子多型解析系を確立した。図1に遺伝子増幅の概要を示した。

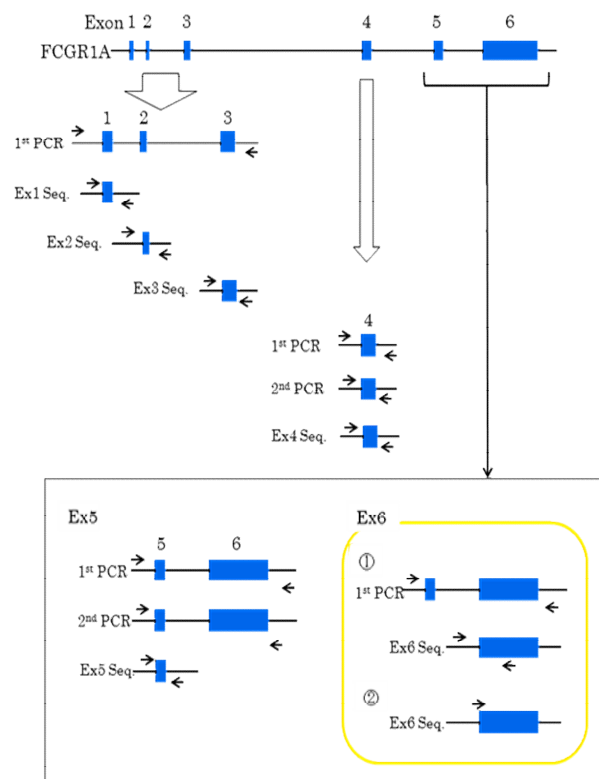


図 2-1 *FCGR1A* 遺伝子増幅の概要

調製した PCR 産物は Exonuclease I Shrimp Alkaline Phosphatase(USP) で酵素処理し、Big Dye 反応の後、Dye EX96 (キアゲン) で精製し、96 穴シークエンサー 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて配列を検出した後 NC\_000001.10 を Reference として比較した。

*FCGR2A* の 497A>G 多型 (H166R) および *FCGR3A* の 634G>T 多型 (V212F) に関しては、TaqMan 法によるタイピングを行った。

#### (3-1) FcγRIIa 発現細胞株の樹立

Open Biosystems 社から購入したクローンを鋳型として FcγRIIa ( His-166 ) cDNA を PCR 法により増幅し、pcDNA3.1/Zeo ベクター ( インビトロジェン ) にサブクローニングした ( pcDNA3.1/Zeo-FcγRIIa )。これを鋳型とし、インバース PCR 法により L273P 変異を導入した発現ベクターを構築した ( pcDNA3.1/Zeo-FcγRIIa(L273P) )。内在性の Fcγ 受容体の発現を欠く Jurkat 細胞にこれらの発現ベクターを遺伝子導入し、30 μg/ml の Bleocin を含む培地 ( RPMI1640/10%FBS ) で 2 週間培養した。薬剤耐性を示した細胞を限界希釈法によりクローン化し、FcγRIIa あるいは FcγRIIa(L273P) を安定発現する Jurkat 細胞株を樹立した ( Jurkat/FcγRIIa、Jurkat/FcγRIIa(L273P) )。樹立細胞株における FcγRIIa の発現は FITC 標識した抗 CD32 抗体 ( BD バイオサイエンス ) による染色後、フローサイトメーター ( BD FACSCantoII ) により確認した。

#### (3-2) IgG 結合能の測定

Jurkat/FcγRIIa あるいは Jurkat/FcγRIIa(L273P) を染色バッファー ( PBS/ 0.5% BSA/ 2 mM EDTA/ 0.05% NaN<sub>3</sub> ) で洗浄後、ポリクローナルヒト IgG ( SIGMA ) と氷上で 30 分間反応させた。染色バッファーで 2 回洗浄した後、DyLight488 標識したヤギ抗ヒト IgG 抗体と氷上で 30 分間反応させ、染色バッファーで 2 回洗浄後、蛍光量をフローサイトメーターを用いて解析した。

#### (3-3) FcγRIIa 架橋実験

Jurkat/FcγRIIa あるいは Jurkat/FcγRIIa(L273P) を Opti-MEM I Reduced-Serum Medium ( インビトロジェン ) で洗浄した後、15 μg/ml の抗 CD32 抗体 ( StemCell Technologies、クローン IV.3、マウス IgG2b ) を含む培地中で氷上 30 分間静置した。培地で 3 回洗浄した後、細胞を培地に再懸濁し、37 °C で 10 分間インキュベートした。その後、ヤギ抗マウス IgG2b 抗体を用いて受容体架橋刺激を加え、各タイムポイントで細胞を回収した。細胞懸濁液に等量の 2x 溶解バッファー ( 100 mM Tris-HCl(pH7.5)、300 mM NaCl、2% NP-40、0.5% deoxycholate、(2x)Protease Inhibitor Cocktail、(2x)Phosphatase Inhibitor Cocktail ) を加えた後、遠心 ( 20,000g、15 分、4 °C ) して細胞溶解液を得た。チロシンリン酸化タンパク質の検出のため、細胞溶解液を SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に転写後、抗リン酸化チロシン抗体 ( GE ヘルスケア ) を用いたウェスタンブロットングを実施した。FcγRIIa のリン酸化の評価においては、細胞溶解液を抗 CD32 抗体およびプロテイン G 結合磁気ビーズ ( ミリポア ) と反応させ、免疫沈降画分を SDS-PAGE および

抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットングにより解析した。ウェスタンブロットングにより検出されたバンド強度は Multi Gauge Software ( 富士フイルム ) によって定量した。

#### (4) 抗体医薬品によるヒト末梢血単核球からのサイトカイン放出の評価

各種抗体医薬品を含む PBS 溶液をポリプロピレン製の 96 穴プレートに添加し、クリーンベンチ内で一晩静置することで、抗体固相化プレートを作製した。プレートを PBS にて洗浄した後、ヒト末梢血単核球 ( CTL ) を  $1.25 \times 10^5$  個/穴となるように播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養した。培養上清に含まれるサイトカイン量を Cytometric Beads Array ( BD ) を用いて測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) IF 反応に関する疫学調査

重篤な IF 反応 ( 注入に伴う反応 ) の自発報告件数を調査したところ、2008 年 4 月から 2013 年 12 月までの 5 年 9 ヶ月間で、セツキシマブが計 227 件と最も多く、次いでインフリキシマブの 119 件であり、3 位のトラスツズマブ 41 件以下に比して 1 桁多いものであった。また、年平均報告数でもセツキシマブ ( 37.8 件 )、インフリキシマブ ( 19.8 件 ) が上位を占め、以下、モガムリズマブ ( 14.0 件 )、ペルツズマブ ( 8.0 件 )、トラスツズマブ ( 6.8 件 ) であった。以上の結果から、セツキシマブを対象に研究を進めた。

表 1-1 IF 反応の報告数が多い医薬品

	合計	平均	2013	2012	2011	2010	2009	2008
セツキシマブ(遺伝子組換え)	227	37.83	27	12	29	38	91	30
インフリキシマブ(遺伝子組換え)	119	19.83	9	15	18	35	31	11
トラスツズマブ(遺伝子組換え)	41	6.83	16	12	3	5	5	0
モガムリズマブ(遺伝子組換え)	28	14.00	12	16				
イデユルスルファゼ(遺伝子組換え)	25	4.17	0	0	0	25	0	0
トシズマブ(遺伝子組換え)	23	3.83	5	3	5	4	4	2
リツキシマブ(遺伝子組換え)	21	3.50	5	3	3	5	4	1
ドキシルピジン塩酸塩	19	3.17	3	0	2	9	5	0
パニツムマブ(遺伝子組換え)	18	4.50	3	4	7	4		
ペバシズマブ(遺伝子組換え)	14	2.33	1	4	4	1	3	1

( 空欄は未発売 )

#### (2) セツキシマブ投与患者試料の収集と遺伝子解析

IF 反応発現に関連しているとされる、抗体依存性細胞障害作用等の免疫細胞の活性化等に関与する Fc 受容体遺伝子 ( FCGR1A、FCGR2A、FCGR3A 等 ) の多型解析を、収集したセツキシマブ投与患者ゲノム DNA32 検体に対して行った。抗体結合の親和性低下が報告されている多型である、FCGR2A の 497A>G 多型 ( H166R、HapMap における

日本人頻度 0.167) および *FCGR3A* の 634G>T 多型 (V212F, HapMap における日本人頻度 0.216) に関しては、解析の結果、多型頻度は同 *FCGR2A* 多型が 0.172、同 *FCGR3A* 多型が 0.375 であった。一方、解析報告がない *FCGR1A* に関しては、全 6 エクソンのシーケンシング系を確立し、遺伝子多型を検出した。その結果、exon 1 の翻訳開始点から 24 塩基上流に 12 検体で T から C への塩基置換がヘテロ接合でみられた。また、1 検体に 247C>T (S66L) の非同義置換が認められた。さらに *FCGR1A* の exon 6 直近上流に 5bp 欠損のある検体が見出され、これは exon 6 の 1020G>A (D324N) 多型と連鎖していることが示唆された。別の抗体医薬品であるペバシズマブ投与患者 105 検体につき *FCGR1A* の多型解析を行ったところ、上記欠失変異が 23 例見出され、全てが D324N 変異を有しており、これら変異は連鎖していることが判明した。また 247C>T (S66L) 多型も 3 症例から見いだされた。

### (3) L273P 遺伝子多型を有する FcγRIIa の機能評価

818T>C (L273P) 遺伝子多型が FcγRIIa の機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、FcγRIIa 野生型あるいは FcγRIIa(L273P) を安定発現する Jurkat 細胞株を樹立した。抗 CD32 抗体を用いたフローサイトメトリー解析の結果、両細胞株における FcγRIIa の細胞表面への発現量は同程度であった (データ未掲載)。まず、L273P 遺伝子多型が FcγRIIa のヒト IgG 結合能に及ぼす影響を明らかにする目的で Jurkat/FcγRIIa、Jurkat/FcγRIIa(L273P) に対するヒト IgG 結合能をフローサイトメーターにより解析した結果、両細胞に対する IgG 結合能に顕著な差は認められなかった (図 3-1)。

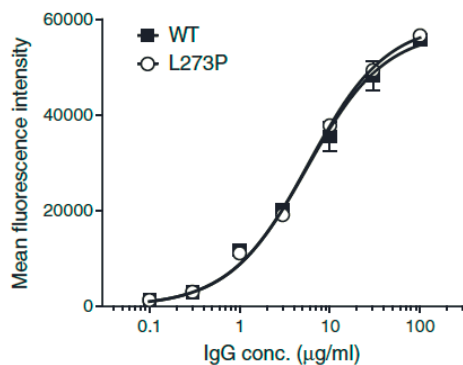


図 3-1 ヒト IgG 結合実験

次に L273P 遺伝子多型が FcγRIIa の細胞内シグナル伝達能に及ぼす影響を明らかにす

る目的で、抗 CD32 抗体を用いた FcγRIIa 架橋実験を実施した。Jurkat/FcγRIIa 細胞を抗 CD32 抗体を用いて架橋刺激した結果、細胞内タンパク質のチロシンリン酸化の顕著な亢進が観察され、FcγRIIa(L273P) を発現する細胞株では野生型の FcγRIIa を発現する細胞株と比較して、より強い細胞内チロシンリン酸化が認められた (図 3-2、 $p < 0.001$  at 1 min)。

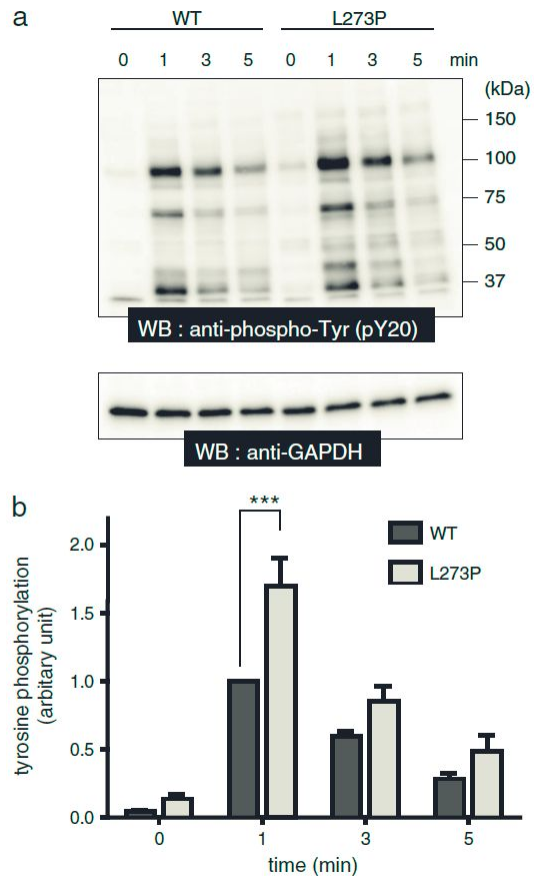


図 3-2 FcγRIIa 架橋刺激による細胞内チロシンリン酸化の亢進 (whole cell lysate)

上記実験においては特に分子量約 40,000、75,000、105,000 のバンドのチロシンリン酸化の顕著な亢進が認められた。このうち、分子量約 40,000 のバンドが、FcγRIIa 自身のチロシンリン酸化を示している可能性を考慮し、架橋刺激した細胞から FcγRIIa を免疫沈降した画分を用いて、架橋刺激に伴う FcγRIIa 自身のチロシンリン酸化状態について検討を行った。その結果、L273P 遺伝子多型を有する FcγRIIa は、野生型の FcγRIIa と比較して、受容体架橋刺激に伴うチロシンリン酸化が有意に亢進していることが明らかとなった (図 3-3、 $p < 0.001$  at 1 min)。

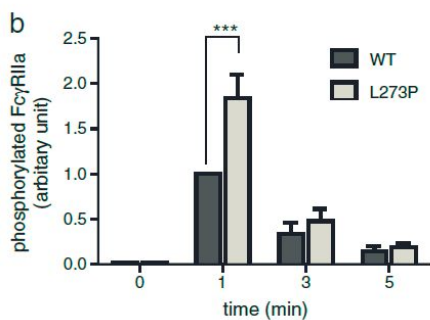
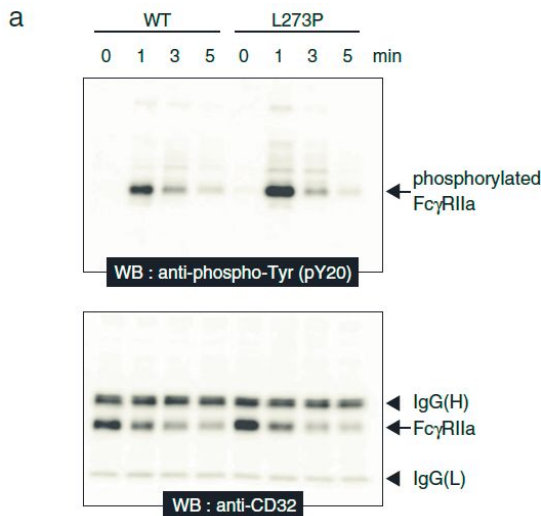


図 3-3 FcγRIIIa 架橋刺激による FcγRIIIa チロシンリン酸化の亢進 (免疫沈降画分)

以上の結果から L273P 遺伝子多型は FcγRIIIa の IgG 結合能には影響を及ぼさない一方で、免疫複合体による受容体活性化を増強する可能性が明らかとなった。FcγRIIIa は抗体医薬品による細胞傷害活性の発揮に加え、IF 反応等の免疫細胞の活性化を介した有害作用の発現に関与することが想定されており、本研究結果は FcγRIIIa の L273P 遺伝子多型が抗体医薬品の有効性・安全性に係わる患者背景因子の一つである可能性を示唆するものである。

#### (4) 抗体医薬品によるヒト末梢血単核球からのサイトカイン放出の評価

抗体医薬品の IF 反応の *in vitro* 予測系を構築する目的で、抗体医薬品によるヒト末梢血単核細胞からのサイトカイン放出誘導を評価可能な実験系の構築を試みた。ポリプロピレン製の 96 穴プレートに抗体医薬品 (10 種類、表 4-1) を固相化した後、ヒト末梢血単核球を加え、24 時間後に培養上清に分泌される 18 種類のサイトカイン・ケモカイン (表 4-2) を Cytometric Beads Array により同時測定した。

mAbs	antigen	Expression in PBMC	IgG subclass
TGN1412	CD28	○	hIgG4
Muromonab-CD3	CD3	○	mIgG2a
Alemtuzumab	CD52	○	hIgG1
Rituximab	CD20	○	hIgG1
Ofatumumab	CD20	○	hIgG1
Mogamulizumab	CCR4	○	hIgG1
Trastuzumab	HER2	×	hIgG1
Cetuximab	EGFR	×	hIgG1
Panitumumab	EGFR	×	hIgG2
Bevacizumab	VEGF	×	hIgG1

表 4-1 固相化した抗体医薬品の一覧

Cytokine, Chemokine	
IL-1b	IL-13
IL-2	IL-17A
IL-4	IL-21
IL-5	MCP-1
IL-6	MIG
IL-8	MIP-1a
IL-9	RANTES
IL-10	TNFα
IL-12/IL-23p40	IFNγ

表 4-2 測定対象としたサイトカイン・ケモカインの一覧

その結果、多くの抗体医薬品により分泌が亢進したもの (IL-6、IL-8、TNFα) 分泌が抑制されたもの (IL-10、IL-12/23p40、MCP-1/CCL2) に加えて、標的抗原がヒト末梢血単核細胞に発現し、IF 反応の発現率が高いと考えられる抗体医薬品 (TGN1412、Muromonab-CD3) により特異的に分泌が亢進するもの (6 種類) を明らかにした。これらの多くは炎症反応に関与することが既知の因子であり、本実験系が IF 反応の予測系として有用である可能性が示唆された。また、抗体医薬品の IgG サブクラスの違いによって誘導能の異なるもの (2 種) を見出し、IgG サブクラスの異なる抗体の IF 反応の発現の差異に関与する可能性を明らかにした。

#### 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 7 件)

Tada M, Ishii-Watabe A, Maekawa K, Fukushima-Uesaka H, Kurose K, Suzuki T, Kaniwa N, Sawada J, Kawasaki N,

Nakajima TE, Kato K, Yamada Y, Shimada Y, Yoshida T, Ura T, Saito M, Muro K, Doi T, Fuse N, Yoshino T, Ohtsu A, Saijo N, Okuda H, Hamaguchi T, Saito Y, Matsumura Y: Genetic polymorphisms of FCGR2A encoding Fcγ receptor IIa in a Japanese population and functional analysis of the L273P variant. Immunogenetics. 64: 869-877 (2012).

門脇京子、石黒昭博、高松昭司、斎藤嘉朗、宇山佳明: 本邦の医薬品添付文書におけるゲノム薬理学関連情報およびその検査法の状況に関する調査・解析. レギュラトリーサイエンス学会誌. 2: 83-92 (2012).

斎藤嘉朗、前川京子、鹿庭なほ子: 日本人を対象にしたゲノム・メタボローム解析によるバイオマーカー探索. Pharmstage, 2012.9, 1-4 (2012).

斎藤嘉朗、前川京子、田島陽子、児玉進、黒瀬光一: 市販後安全性確保に係るバイオマーカーと診断. レギュラトリーサイエンス学会誌. 3: 43-55 (2013).

斎藤嘉朗、中村亮介、黒瀬光一: 副作用バイオマーカーの探索と臨床応用研究の現状について. 臨床病理レビュー, 150: 27-33 (2013).

斎藤嘉朗、佐井君江、鹿庭なほ子、田島陽子、石川将己、最上(西巻)知子、前川京子: バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けて. 薬学雑誌, 133: 1373- 1379 (2013).

石井明子、鈴木琢雄、多田稔、川崎ナナ、抗体医薬品の分子設計、薬剤学 74,1-8 (2014).

〔学会発表〕(計 7件)

多田稔、石井明子、鈴木琢雄、川崎ナナ: 抗原 抗体複合体形成様式に着目した抗TNF 抗体医薬品の生物活性評価に関する研究. 第 84 回日本生化学会大会 (2011.9、京都)

斎藤嘉朗、佐井君江、石井明子: バイオ医薬品と化学合成医薬品の相互作用、日本薬物動態学会第 27 回年会 (2012.11、東京)

斎藤嘉朗、前川京子、佐井君江、鹿庭なほ子、黒瀬光一: ヒト試料を用いたバイオマーカー研究の現状と問題点. 第 33 回日本臨床薬理学会学術総会 (2012.11、沖縄)

斎藤嘉朗、頭金正博、中村亮介、関根章博、鹿庭なほ子: 重篤副作用における GWAS 解析. 日本人類遺伝学会第 58 回大会 (2013.11、仙台)

斎藤嘉朗、児玉進、杉山永見子、中村亮介: 重篤副作用に関する予測ゲノムマーカー. 日本薬学会第 134 年会 (2014.3、熊本)

石井明子、多田稔、鈴木琢雄、川崎ナナ、次世代抗体医薬品の非臨床評価 日本薬学会第 134 年会 (2014.3 月、熊本)

斎藤嘉朗: 抗体医薬を含むバイオ医薬品の

薬物動態、薬物間相互作用. 日本薬物動態学会 第 28 回ワークショップ (2014.5、東京)

〔図書〕(計 1 件)

斎藤嘉朗、中野泰子: 化学同人、バイオ医薬品 (26 章 テーラーメイドゲノム創薬) 2013, 8 ページ

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

斎藤 嘉朗 (SAITO, Yoshiro)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部長

研究者番号: 50215571

(2)研究分担者

石井 明子 (ISHII, Akiko)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・第二室長

研究者番号: 50291117

加藤 健 (KATO, Ken)

国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号: 50501855

黒瀬 光一 (KUROSE, Koichi)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・第三室長 (平成 23, 24 年度)

研究者番号: 30280754

中村 亮介 (NAKAMURA, Ryosuke)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・第三室長 (平成 25 年度)

研究者番号: 50333357

(3)連携研究者

多田 稔 (TADA, Minoru)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・第三室長

研究者番号: 50506954

杉山永見子 (SUGIYAMA, Emiko)

国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部・第三室 非常勤職員

研究者番号: 40574695