

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790183

研究課題名(和文) 膜結合型TNF との複合体形成に着目した抗TNF 抗体医薬品の生物学的特性解析

研究課題名(英文) Effects of immune-complex formation on the biological activities of anti-TNFalpha monoclonal antibody products

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：抗TNF 抗体医薬品の生物学的特性の解析を目的として、抗原-抗体複合体形成能に着目した研究を行い、1)複合体形成能(形成される複合体の分子サイズ)は抗TNF 抗体医薬品の種類によって異なること、2)複合体形成能の差異がFc 受容体の活性化に関与することを明らかにした。複合体形成能の差異は抗原結合能親和性のみならず抗原認識エピトープの違いに起因すると考えられ、抗原との複合体形成様式が各抗TNF 抗体医薬品を特徴づける重要な指標の一つであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To reveal the differences in the biological activities of anti-TNF monoclonal antibody products, effects of immune-complex formation on their biological activities were examined. The molecular sizes of immune-complex formed by TNF and anti-TNF monoclonal antibodies were different in each antibody. Fc R reporter cell assay showed that the activations of Fc R by each antibody were dependent on the size of immune-complex. These results suggest that the difference in the formation of immune-complex is an important property characterizing anti-TNF monoclonal antibody products.

研究分野：生物薬品学

キーワード：抗体医薬品 TNF

## 1. 研究開始当初の背景

現在までに、インフリキシマブ(ヒト/マウスキメラ抗体)、アダリムマブ、ゴリムマブ(ヒト抗体)、エタネルセプト(TNF受容体-Fc融合タンパク質)、セルトリスマブペゴル(ヒト化抗体 Fab 断片-PEG 融合タンパク質)という異なる分子骨格をもった5つの抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品が世界で承認されており(表1)、これらは主に可溶性TNF $\alpha$ の中和により抗炎症作用を発揮するとされている。

表1: 既承認の抗TNF $\alpha$ 抗体の特徴

	Infliximab	Adalimumab	Golimumab	Etanercept	Certolizumab pegol
構造	Chimeric IgG1	Human IgG1	Human IgG1	TNFR-Fc fusion	Humanized antibody Fab' conjugated to PEG
分子量	~149 kDa	~148 kDa	~147 kDa	~150 kDa	~91 kDa
主な適応疾患	クローン病 潰瘍性大腸炎 関節リウマチ	クローン病 関節リウマチ 強直性脊椎炎	関節リウマチ 強直性脊椎炎 (クローン病: 治療中)	関節リウマチ 強直性脊椎炎	クローン病 関節リウマチ
投与方法 (関節リウマチ)	点滴静注 (5-10 mg/kg 8 weeks)	皮下注射 (40 mg/2 weeks)	皮下注射 (50 mg/4 weeks)	皮下注射 (25-50 mg/week)	皮下注射 (400 mg/4 weeks)
血中半減期 <sup>a)</sup>	7.7-9.5日	~14日(10-20日)	~14日	~4.25日	~14日
可溶性TNF $\alpha$ との 親和性(K <sub>d</sub> ) <sup>b)</sup>	~44 pM	~127 pM	~18 pM	~11 pM	~90 pM
ADCC/DC 活性	○	○	○	△	×
リバースシグナル	○	○	○	△ or ×	?

一方、マクロファージ等のTNF $\alpha$ 産生細胞では細胞表面に膜結合型TNF $\alpha$ が存在し、TNF受容体発現細胞との細胞間接着を介して炎症性シグナルを伝達することが知られており、抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品の薬効発現における膜結合型TNF $\alpha$ 発現細胞を標的とした作用の関与も示唆されている。抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品が膜結合型TNF $\alpha$ に結合すると、ナチュラルキラー細胞等の免疫系エフェクター細胞を介した抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性が発揮されるほか、膜結合型TNF $\alpha$ 発現細胞に対して細胞死を誘導する逆向きシグナル(リバースシグナル)を伝達し得ることが報告されている(図1)。

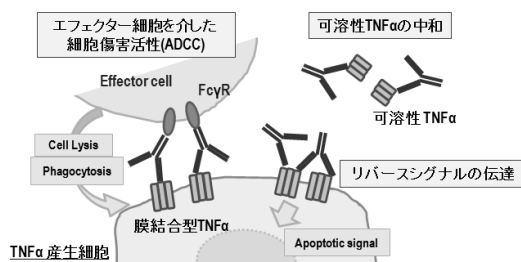


図1 抗TNF抗体医薬品の作用機序

しかしながら、このような可溶性TNF $\alpha$ および膜結合型TNF $\alpha$ を標的とした多様な作用発現における、各々の抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品の生物活性の差異やその要因となる特性についての解析は十分になされていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

我々はこれまでに各種抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品を用いた予備的な検討により、抗原であるTNF $\alpha$ との抗原-抗体複合体形成能が抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品により異なること、これにより免疫細胞上に発現するFc $\gamma$ 受容体活性化能に差異が生じる可能性を見出してきた。これを踏まえて、本研究では抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品の抗原-抗体複合体形成能に着目し、複合体形成能の差異が生物活性に及ぼす影響を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1)可溶性TNF $\alpha$ -抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品によって形成される複合体の分子サイズの評価

抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品アダリムマブ、インフリキシマブ、ゴリムマブおよびTNF受容体-Fc融合タンパク質医薬品エタネルセプトを試料とし、可溶性TNF $\alpha$ と異なるモル比で混合した。形成された複合体の粒子径を動的光散乱法により測定し(ZetaSizer Nano、Malvern)得られた平均粒子径から複合体の推定分子量を算出した。

### (2)Fc $\gamma$ 受容体結合能の評価

DyLight488 Antibody Labeling Kit (PIERCE)を用いて、アダリムマブ、インフリキシマブ、ゴリムマブを蛍光標識した。Fc $\gamma$ RIIaを安定発現するJurkat細胞株(Jurkat/Fc $\gamma$ RIIa)は終濃度10%となるようにウシ胎児血清(FBS)を添加したRPMI1640培地(Invitrogen)で培養した。アッセイ当日、細胞を遠心により回収し、染色バッファー(PBS + 0.5% BSA, 2 mM EDTA, 0.05% NaN<sub>3</sub>)で2回洗浄した。90  $\mu$ lあたり1 $\times$ 10<sup>5</sup>個の細胞を含むように調製した細胞懸濁液を96穴プレートに播種し、終濃度の10倍の濃度となるように調製した各抗体溶液10  $\mu$ lを添加して、氷上で30分間反応させた。その後、染色バッファーを用いて2回洗浄を行い、7-AAD(BD)を添加してフローサイトメーター(BD, FACSCantoII)で解析を行った。前方散乱光(FSC)、側方散乱光(SSC)および7-AADの染色強度によりゲートを指定した生細胞集団のAlexa488蛍光強度の平均値(Mean Fluorescence Intensity: MFI)を算出し結合の指標とした。

### (3)可溶性TNF $\alpha$ -抗TNF $\alpha$ 抗体医薬品複合体によるFc $\gamma$ 受容体活性化能の評価

エフェクター細胞としてFc $\gamma$ 受容体およびカルシウムシグナル応答性のレポーター遺伝子(NFAT-Luc)を発現するJurkat細胞(Jurkat/Fc $\gamma$ R/NFAT-Luc)を用いた。レポーター細胞(1 $\times$ 10<sup>5</sup> cells)を90  $\mu$ lのOpti-MEM I Reduced Serum Media (Invitrogen)に懸濁し、96穴培養プレートに播種した後、終濃度の10倍の濃度となる

ように調製した各抗体溶液 10  $\mu$ l を添加して、37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 4 時間培養した。100  $\mu$ l の ONE-Glo Luciferase Assay 試薬 (Promega) を添加して懸濁した後、懸濁液 100  $\mu$ l を白色アッセイプレートに移し、発光プレートリーダー (Enspire, PerkinElmer) を用いてレポーター細胞で発現誘導されたルシフェラーゼ活性を測定した。

#### (4) 膜結合型 TNF $\alpha$ 発現細胞株の樹立

PCR 法により、プロテアーゼ認識領域にアミノ酸点変異 (R78T/S79T) を導入した膜結合型 TNF $\alpha$  (tmTNF $\alpha$ ) cDNA を作製し、pVITRO1-neo ベクター (Invivogen) にサブクローニングした (pVITRO1-neo-tmTNF $\alpha$ )。Jurkat 細胞に pVITRO1-neo-tmTNF $\alpha$  を遺伝子導入した後、0.5 mg/ml の G418 (ナカライテスク) を含む RPMI1640/10% FBS で培養し、安定発現細胞株を選別した。その後、限界希釈法によりシングルクローン化を行い、膜結合型 TNF $\alpha$  発現細胞株 (Jurkat/tmTNF $\alpha$ ) を樹立した。

#### (5) 膜結合型 TNF $\alpha$ に対する抗 TNF $\alpha$ 抗体医薬品の結合親和性の評価

Jurkat/tmTNF $\alpha$  を標的細胞として (2) と同様の手法により、フローサイトメーターを用いた解析を実施した。

#### (6) 膜結合型 TNF $\alpha$ 発現細胞を標的とした抗 TNF $\alpha$ 抗体医薬品による Fc $\gamma$ 受容体活性化能の評価

Jurkat/tmTNF $\alpha$  を標的細胞、Jurkat/Fc $\gamma$ RIIIa/NFAT-Luc をエフェクター細胞として用いた。標的細胞：エフェクター細胞比が 1:10 となるように細胞懸濁液を調製し、(3) と同様の手法によりレポーター細胞で発現誘導されたルシフェラーゼ活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 可溶性 TNF $\alpha$ との複合体形成能及び Fc $\gamma$ 受容体活性化能

抗 TNF $\alpha$  抗体医薬品インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ及び TNFR-Fc 融合タンパク質医薬品エタネルセプトを試料とし、動的光散乱法を用いて可溶性 TNF $\alpha$  との複合体形成能を評価した。その結果、エタネルセプトと比較して 3 つの抗体医薬品は可溶性 TNF $\alpha$  と結合して巨大な抗原-抗体複合体を形成すること、複合体形成能はインフリキシマブ > ゴリムマブ > アダリムマブの順に強いことが明らかとなった (図 2)。

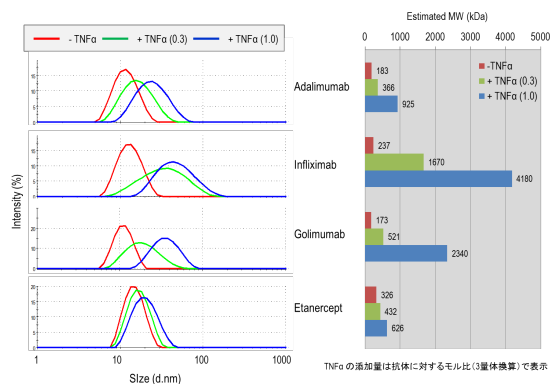


図 2 可溶性 TNF $\alpha$  との複合体形成能

これらの抗原-抗体複合体形成能の差異が Fc $\gamma$  受容体を介した免疫細胞の活性化に及ぼす影響を明らかにする目的で、Fc $\gamma$  受容体に対する結合能を評価した。TNF $\alpha$  非存在下における各抗体医薬品単独での Fc $\gamma$  受容体結合能は何れも同程度であり (図 3)、異なるモル比の TNF $\alpha$  存在下においてもその結合能に顕著な差は認められなかった (図 4)。

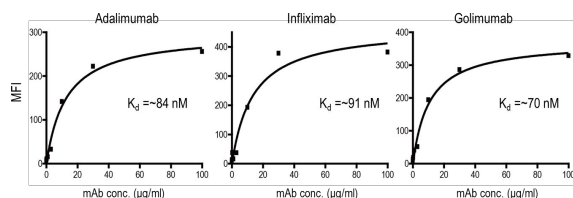


図 3 TNF $\alpha$  非存在下における Fc $\gamma$  受容体結合能

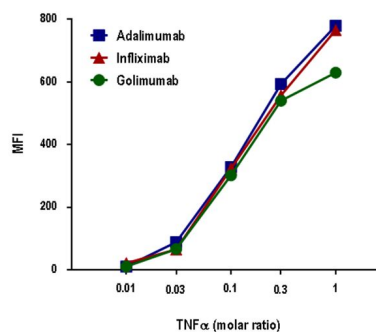


図 4 TNF $\alpha$  存在下における Fc $\gamma$  受容体結合能

一方、これらの抗原-抗体複合体による Fc $\gamma$  受容体活性化能は抗体によって異なり、可溶性 TNF $\alpha$  存在下においてより巨大な複合体を形成するインフリキシマブは他の抗体に比べて強い Fc $\gamma$  受容体活性化を誘導することが明らかとなった (図 5)。

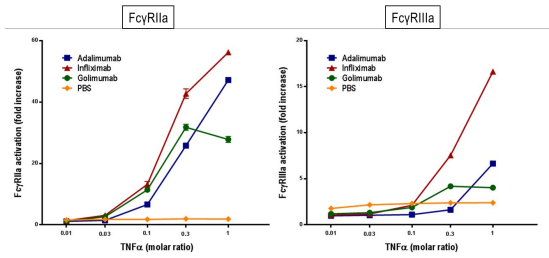


図5 TNF $\alpha$ -抗体複合体による Fc $\gamma$  受容体活性化

## (2)膜結合型 TNF $\alpha$ との結合能および Fc $\gamma$ 受容体活性化能

膜結合型 TNF $\alpha$  に対する抗 TNF $\alpha$  抗体医薬品の作用を検討するため、膜結合型 TNF $\alpha$  を安定発現する細胞株 (Jurkat/tmTNF $\alpha$ ) を樹立し、膜結合型 TNF $\alpha$  に対する結合能を評価した。可溶性 TNF $\alpha$  に対する結合親和性はインフリキシマブの方がアダリムマブに比べて強いことが報告されている一方で (表 1)、インフリキシマブおよびアダリムマブの膜結合 TNF $\alpha$  に対する結合能は同程度であることが明らかとなった (図 6)。

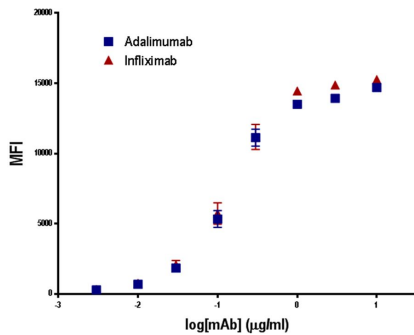


図6 膜結合型 TNF $\alpha$  結合能

次に、膜結合型 TNF $\alpha$  安定発現細胞株およびレポーター細胞 (Jurkat/Fc $\gamma$ R/NFAT-Luc) を抗 TNF $\alpha$  抗体医薬品存在下で共培養して、抗原結合に依存した Fc $\gamma$  受容体の活性化を評価した。その結果、インフリキシマブはアダリムマブに比べてより強い Fc $\gamma$  受容体活性化能を示すことが明らかとなり (図 7)、抗原認識エピトープの違いによる複合体形成能の差異が膜結合型 TNF $\alpha$  発現細胞に対するエフェクター細胞の活性化、すなわち ADCC 活性の発揮に関与することが示唆された。

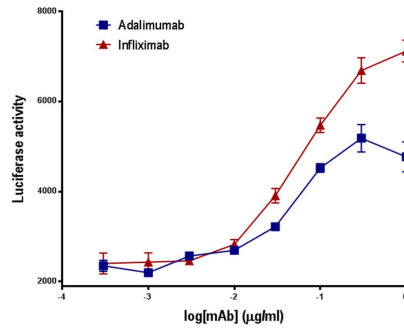


図7 膜結合型 TNF $\alpha$  発現細胞を標的とした抗 TNF $\alpha$  抗体による Fc $\gamma$  受容体活性化能

以上の結果から、抗 TNF $\alpha$  抗体医薬品による免疫細胞の活性化等の生物活性の発揮には、抗原結合親和性のみならず、各々の抗体の認識する抗原エピトープの差異に起因すると考えられる抗原-抗体複合体形成能の差異が関与する可能性が明らかとなった。抗原との複合体形成様式は各抗 TNF 抗体医薬品を特徴づける重要な指標の一つ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)

- 1) Tada M.; Ishii-Watabe A.; Suzuki T.; Kawasaki N. Development of a cell-based assay monitoring the activation of Fc $\gamma$ RIIa for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. *PLOS ONE*, 2014, 9(4),e95787

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

## 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・

第3室 室長

研究者番号: 50506954