

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860102

研究課題名(和文) ヒト血液中における抗体医薬品の糖鎖修飾の解明と薬効との相関解析

研究課題名(英文) Correlation analysis between glycosylation and the efficacy of antibody preparation in human blood

研究代表者

津田 真弘 (TSUDA, Masahiro)

京都大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：10726813

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)：

本研究では、抗体医薬品に付加する糖鎖の薬効や薬物動態に与える影響を明らかにするため、抗CD20モノクローナル抗体リツキシマブの糖鎖構造の解析を行った。その結果、リツキシマブには数種類の糖鎖修飾体が存在することを明らかにした。ラットを用いて動態解析を行い、糖鎖修飾体の相対含有率が経時的に変化することを示した。その経時的変化は、リツキシマブの体内動態に影響を与えることが明らかになった。以上より、リツキシマブに付加する糖鎖の役割に関する新しい知見を得た。

研究成果の概要(英文)：

In current study, we analyzed the carbohydrate structure of anti-CD20 monoclonal antibody rituximab to evaluate effect of glycosylation on the efficacy and the pharmacokinetics of antibody preparation. Several glycan species were identified in rituximab. The relative content of glycoforms changed in a time-dependent manner. These changes affected to pharmacokinetics of rituximab. In conclusion, we obtained novel findings in the role of carbohydrate of rituximab.

研究分野：医療薬剤学

キーワード：抗体 糖鎖 癌 質量分析 バイオテクノロジー 薬物動態 血中濃度 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

近年、抗体医薬品はがんや自己免疫疾患の分野において重要な役割を果たしている。抗体医薬品は製造段階において動物由来細胞を用いており、構造上の多様性を有している。特に抗体の定常部に付加する糖鎖は数十種におよび、糖鎖の構造は抗体医薬品の薬理活性に影響することが示唆されている。しかし、我が国の治験を含む臨床試験においては、多くの場合、抗原抗体反応に基づいた薬理活性及び薬物動態の評価が行われているため、糖鎖等の構造上の変化による薬理活性、薬物動態への影響は反映されていない。さらに、抗体医薬品は製造過程だけでなく、投与後生体内においても糖鎖付加等の修飾を受けることから、薬効発現の個人差の原因の一つとなりうる可能性が考えられる。つまり、抗体医薬品における糖鎖付加の状態を明らかにすることは、抗体医薬品の薬効や副作用発現の個体差の解明につながることを期待される。

一方、飛行時間型質量分析計 TOF-MS 技術の進歩により、化合物の精密な質量分析が実施できる。抗体医薬品のプロテオミクス解析を可能とする TOF-MS を用いて抗体医薬品への糖鎖付加などの修飾体の構造・性質の解析を行うことで、抗体医薬品の有効性・安全性の向上に貢献出来るのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

代表的な抗体医薬品である抗 CD20 モノクローナル抗体リツキシマブを用い、TOF-MS 技術を用いて糖鎖構造を解析し、抗体医薬品に付加する糖鎖が薬効や薬物動態に与える影響を明らかにする。さらに、ヒト血中におけるリツキシマブの糖鎖構造を調べること、生体内での糖鎖構造の変化と役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

TOF-MS を用いてリツキシマブ測定系を構築し、製剤レベルにおけるリツキシマブの糖鎖構造を調べる。ラットを用いてリツキシマブ体内動態解析を行い、ELISA 法による血中濃度の定量と、体内での糖鎖構造の経時的变化を確かめる。さらに、糖鎖構造と薬理活性や体内動態との相関を調べる。リツキシマブ投与症例のヒト血中におけるリツキシマブの血中濃度推移や糖鎖構造について検証し、血中における糖鎖構造の変化を評価する。ヒト血液検体を用いる研究部分に関しては、京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院 医の倫理委員会の承認を得る。

4. 研究成果

リツキシマブを酵素であるパピインを用いて断片化することで TOF-MS におけるリツ

キシマブ測定系を構築し、リツキシマブ製剤において数種類の糖鎖修飾体が存在することを明らかにした。

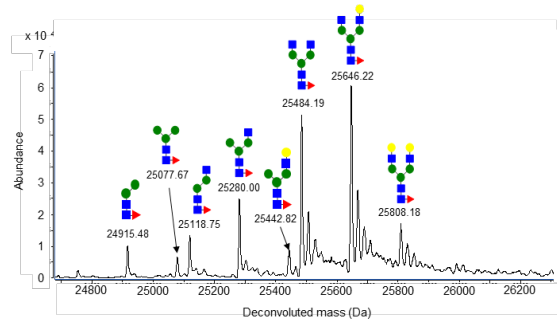


図: TOF-MS によるスペクトルとリツキシマブに付加する糖鎖修飾体の構造

次に、ラット体内において、内因性の IgG 抗体とリツキシマブ抗体を分離し糖鎖構造の解析を行うために、免疫沈降法を用いてラット血液中からリツキシマブを単離精製する方法を確立した。ラットを用いたリツキシマブ体内動態解析を行い、ヒトと同様の血中濃度推移を取ることを確認した。さらに TOF-MS によって糖鎖修飾体の相対含有率を測定し、経時的に変化することを明らかにし、この糖鎖構造の変化は血漿中に存在する酵素によって引き起こされていることを示した。一部の糖鎖構造はリツキシマブのクリアランスに影響した。一方、ラット体内における糖鎖構造の経時的变化が薬理活性に与える影響を精査したところ、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性及び補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性には影響しないことを明らかにした。

これらの結果を踏まえ、ヒト血液検体を用いて ELISA 法による血中リツキシマブ濃度の定量と TOF-MS による糖鎖修飾体の構造解析を行い、現在、その解析と論文投稿の準備を行っている。

以上、製剤レベルにおいてもリツキシマブには多様な糖鎖修飾体が存在することを明らかにした。また、生体内においても糖鎖構造は経時的に変化し、一部の糖鎖構造はリツキシマブの体内動態に影響を与えることを明らかにした。

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3件)

Ito S, Yano I, Hashi S, Tsuda M, Sugimoto M, Yonezawa A, Ikeda A, Matsubara K. Population pharmacokinetic modeling of levetiracetam in pediatric and adult patients with epilepsy by using

routinely monitored Data. Ther. Drug Monit., in press 査読有
DOI:10.1097/FTD.0000000000000291

Shinsako K, Yano I, Tanaka A, Fukudo M, Tsuda M, Sato E, Kobayashi T, Yamasaki T, Okubo K, Kamba T, Yoshimura K, Ogawa O, Matsubara K. Everolimus blood concentrations did not predict interstitial lung disease in patients with metastatic renal cell carcinoma. Jpn. J. Ther. Drug Monit., 33(1), 1-8, 2016 査読有
<http://jstmd.umin.jp/index.html>

片田 佳希、中川 俊作、田上 裕美、津田 真弘、都築 徹教、端 幸代、小高 瑞穂、米澤 淳、萱野 勇一郎、矢野 育子、南方 謙二、坂田 隆造、松原 和夫、プロトコルに基づいた薬物治療管理の臨床アウトカム評価 TDM オータを含めたバンコマイシン処方設計支援、医療薬学、42 巻 1 号、14-22、2016 査読有
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jjphcs/-char/ja>

[学会発表](計 15 件)

津田 真弘、大谷 祐基、米澤 淳、池見 泰明、大村 友博、中川 俊作、今井 哲司、中川 貴之、矢野 育子、松原 和夫、インフリキシマブ先行と後続品における糖鎖構造の比較、日本薬学会 第 136 年会、2016 年 3 月 26 日~29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

岩上 智香、津田 真弘、杉本 充弘、米澤 淳、都築 徹教、松原 惇起、中川 俊作、矢野 育子、中川 貴之、松原 和夫、シクロスポリンおよびタクロリムスの血中濃度測定系に対するアゾール系抗真菌薬の影響、日本薬学会 第 136 年会、2016 年 3 月 26 日~29 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Ayano Inoba, Kaori Kadoyama, Keiko Minami, Akiko Tamon, Masahiro Tsuda, Toshiyuki Sakaeda, Yasushi Okuno Anti-multiple myeloma agents-associated taste dysfunction: An analysis of the FAERS database, AFPS2015 (Asian Federation for Pharmaceutical Sciences Conference), 2015 年 11 月 25 日-11 月 27 日、Bangkok (Thailand)

井野場 郁乃、角山 香織、南 景子、多門 啓子、津田 真弘、栄田 敏之、奥野 恭史、FDA 大規模有害事象自発報告データベ

スを用いた多発性骨髄腫治療薬投与に伴う味覚障害の解析、第 25 回日本医療薬学会年会、2015 年 11 月 21 日~23 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

大谷 祐基、米澤 淳、今井 哲司、津田 真弘、兼吉 真千子、池見 泰明、大村 友博、中川 俊作、矢野 育子、北野 俊行、高折 晃史、松原 和夫、生体内におけるリツキシマブの経時的構造変化の解析、第 53 回日本癌治療学会学術集会、2015 年 10 月 29 日~31 日、国立京都国際会館 (京都府京都市)

谷崎 亮介、大谷 祐基、米澤 淳、津田 真弘、池見 泰明、今井 哲司、中川 俊作、大村 友博、中川 貴之、松原 和夫、ラット血中における Rituximab の構造変化と抗体依存性細胞傷害活性への影響、第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会、2015 年 10 月 17 日、大阪大谷大学 (大阪府富田林市)

都築 徹教、矢野 育子、中川 俊作、津田 真弘、上杉 美和、杉本 充弘、岡島 英明、海道 利実、上本 伸二、松原 和夫、生体肝移植術後のタクロリムス静脈内導入における点滴速度の適正化、第 51 回日本移植学会総会、2015 年 10 月 2 日、3 日、ホテル日航熊本 (熊本県熊本市)

Yuya Matsuda, Ikuko Yano, Satoshi Imai, Atsushi Yonezawa, Takashi Yamamoto, Mitsuhiro Sugimoto, Masahiro Tsuda, Tetsunori Tsuzuki, Shunsaku Nakagawa, Tomohiro Omura, Takayuki Nakagawa, Fengshi Chen, Hiroshi Date, Kazuo Matsubara Effect of itraconazole on pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine in patients with lung transplantation, 75th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2015, 2015 年 9 月 29 日-10 月 3 日, Düsseldorf (Germany)

佐藤 愛由子、津田 真弘、都築 徹教、杉本 充弘、矢野 育子、中川 貴之、松原 和夫、新規抗てんかん薬の使用状況と血中濃度モニタリングの実際、第 32 回日本 TDM 学会・学術大会、2015 年 5 月 23 日、24 日、キッセイ文化ホール (長野県松本市)

都築 徹教、矢野 育子、中川 俊作、津田 真弘、上杉 美和、杉本 充弘、海道 利実、上本 伸二、松原 和夫、生体肝移植術後のタクロリムス静脈内導入における血中濃度の評価、第 32 回日本 TDM 学会・学術大会、2015 年 5 月 23 日、24 日、キッセイ文化ホール (長野県松本市)

大谷 祐基、松村 健吾、米澤 淳、今井 哲司、大村 友博、津田 真弘、中川 貴之、松原 和夫、抗体医薬品が有する糖鎖構造の定性・定量的解析、日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2015、2015 年 3 月 14 日、15 日、みやこめっせ（京都府京都市）

大谷 祐基、松村 健吾、米澤 淳、大村 友博、津田 真弘、中川 貴之、松原 和夫、LC/TOF-MS を用いた抗体医薬品の糖鎖解析、第 24 回日本医療薬学会、2014 年 9 月 27 日、28 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

松村 健吾、大谷 祐基、大村 友博、米澤 淳、津田 真弘、吉貴 達寛、松原 和夫、LC/QTOF-MS による G-CSF バイオ後続品の定性分析、第 24 回日本医療薬学会、2014 年 9 月 27 日、28 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

石橋 直哉、津田 真弘、佐藤 裕紀、池見 泰明、松田 裕也、八田 眞菜美、小枝 正吉、高橋 和也、大原 雄希、志賀 弘康、中川 俊作、深津 祥央、米澤 淳、田崎 嘉一、宮本 篤、井関 健、白井 正信、松原 和夫、薬剤師不在の過疎地域病院への薬剤師派遣による医療支援の試み、第 24 回日本医療薬学会、2014 年 9 月 27 日、28 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

清水 倫子、津田 真弘、池見 泰明、深津 祥央、石塚 良子、米澤 淳、松村 由美、松原 和夫、B 型肝炎ウイルス再活性化初期スクリーニング検査の実施状況調査、第 24 回日本医療薬学会、2014 年 9 月 27 日、28 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津田 真弘 (TSUDA, Masahiro)

京都大学・大学院薬学研究科・特定講師

研究者番号： 1 0 7 2 6 8 1 3

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし