

抗体の糖鎖構造の違いに基づき分離可能な 新奇アフィニティー分離剤

寺尾 陽介*・田中 亨・山中 直紀・遠藤 諭・井出 輝彦

緒 言

近年、がんや自己免疫疾患治療薬として、抗体医薬品の開発が大きく進展しており、医薬品売り上げトップ10のうち半分を占めるに至っている¹⁾。一方、現状の医療費高騰問題や、より低コストな抗体医薬品の需要から、低投与量で、より薬効の高い抗体医薬品の開発が求められている。より高機能な次世代抗体医薬品の例として、抗がん剤などでは高い細胞殺傷作用（ADCC活性：抗体依存性細胞傷害）を得られるよう改良した抗体、血中安定性を改良した抗体、2つの特異的な抗原結合部位を有する抗体などの開発が進行している²⁾。特に、ADCC活性を向上させた抗体医薬品の開発が広く行われている。ADCC活性の作用機序として、抗原を認識した抗体が免疫細胞上のFc受容体（Fcγ Receptor IIIa）に結合し、その後、免疫細胞から免疫シグナルが発せられ、抗原（抗がん剤の場合には、がん細胞）を攻撃、破壊することが明らかにされている³⁾。また、抗体とFc受容体との結合には抗体のアミノ酸配列のみならず、抗体に結合している糖鎖構造もその結合に大きく関与していることが明らかになっており⁴⁾、抗体と免疫細胞上のFc受容体（Fcγ Receptor III）との結合に関する機能解明がなされている。糖鎖構造を制御することで抗体医薬品の活性（ADCC活性）を高めることが可能となっており、特にN-結合型糖鎖におけるコアフコース欠損型の糖鎖構造がADCC活性を高めることが見いだされ⁵⁾、一部この原理を利用した高機能な抗体医薬品も製品化されている⁶⁻⁷⁾。

抗体は、DNA配列の情報を基に動物細胞（抗体医薬品の場合はCHO細胞など）の培養により基本的には単一のアミノ酸配列を持つタンパク質として生産される。その際に、抗体のFc領域の特定位置に動物細胞特有の糖鎖修飾がなされ、さまざまな糖鎖構造をもった混合物として生産される。抗体医薬品は、抗体生産細胞の培養後、除細胞、カラムクロマトグラフィーによる精製、ろ過などの工程を経て製剤化される。このように生産される抗体は多様な糖鎖構造を有しており、糖鎖構造の型により活性（特にADCC活性）にも影響が出てくることから⁸⁾、その糖鎖構造の制御や制御方法の開発が求めら

れている。

また、次世代の高機能抗体医薬品の開発に、各種Fc受容体との結合力の評価が利用され、Fc受容体（Fcγ Receptor IIIa）との結合力、親和性を簡便に評価することが求められていた。

筆者らは、これまでにFc受容体の一つであるヒトFcγ Receptor Iに着目し、抗体との高い親和性を利用した抗体精製のアフィニティークロマトグラフィー用分離剤の開発を進めてきている⁹⁾。同分離剤は、近年、特に抗体凝集体や抗体薬物複合体（ADC）の分離に適応できるのではないかと注目されている。

本稿では、新たに抗体の糖鎖構造の違いを識別するFc受容体（Fcγ Receptor IIIa）を利用した、高機能抗体医薬品分離のための分析カラム開発結果に関して報告する。本開発品はTSKgel[®] FcR-IIIa-NPRとして製品化、販売されている。

方 法

1. 発現系構築 ヒトFcγ Receptor IIIa（以下、FcR）のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を遺伝子組換え発現用プラスミドベクターに挿入し、生産用大腸菌を形質転換することで大腸菌発現系を構築した。発現ベクターにはpTrc99Aを用い、trcプロモーターの下流にシグナルペプチド遺伝子、FcR遺伝子、評価用または固定化用タグ遺伝子の順に遺伝子を挿入した。生産用大腸菌として、W3110株を使用した。なお、FcRのアミノ酸配列は公的データベースなどで公表されている¹⁰⁾。

2. 安定化FcRの作製 ヒト由来タンパク質であるFcRの各種安定性を向上させるため、ランダム変異導入による安定化変異体の作製をエラープロンPCR法¹¹⁾を用いて行った。FcR配列に変異を導入した変異ライブラリーから、生産性、酸処理後の残存活性を指標とした耐酸性の向上した変異株を取得し、変異を組み合わせることで耐酸性の向上した改良型ヒトFcR遺伝子を作製した。

3. FcRの生産 遺伝子組換え大腸菌の当社独自組成培地を用いた高密度培養法により、大腸菌内にFcRを発現させ、生産した。大腸菌を回収、界面活性剤や酵

*著者紹介 東ソー株式会社ライフサイエンス研究所（主任研究員） E-mail: yousuke-terao-uc@tosoh.co.jp

素による抽出の後、最適化された条件によるカラムクロマトグラフィーにより、高純度にFcRを精製した¹²⁾。精製した高純度FcRに関して各種規格値を設定し、品質を測定した。

4. FcR固定化分離剤およびFcRカラムの作製 当社独自の分析用ベース基材（非多孔性、平均粒子径5 μm）に固定化用官能基を導入し、FcRを固定化した。作製したFcR固定化分離剤をカラムへと充填し、FcRカラムを作製した。

5. FcRカラムの評価 作製したFcRカラムを用いて、目的抗体を中性緩衝液で結合させ、酸性緩衝液のグラジエント溶出により、抗体の分離クロマトグラムを得た。

6. FcRカラム分離フラクションの評価 FcRカラムにより分離された抗体をピークごとに分取し、分取フラクションに含まれている抗体の糖鎖構造をLC-MSを用いた市販標準品との比較により解析した。また、同様に各分取フラクションに含まれる抗体のADCC活性をADCCアッセイキット（プロメガ社）により測定した。

結果と考察

1. FcR発現系の構築 ヒトFcRのアミノ酸配列(Uniprot: P08637)の細胞外領域をコードするポリヌクレオチド配列を大腸菌コドンへと変換最適化し、発現タンパク質を大腸菌のペリプラズム領域に分泌させるPelBシグナルペプチドをN末端側に、評価用または固定化タグをC末端側に挿入したFcR遺伝子を発現ベクターpTrc99Aに挿入した。FcR生産用大腸菌W3110株を形質転換し、FcR発現系を構築した。使用した宿主ベクター系は安全性が確認され、経済産業省のGILSPリストに掲載されている。

2. 安定化FcRの作製 ヒト天然型FcR遺伝子を鋳型に、FcR遺伝子中に1~2個のアミノ酸が置換されるよう条件最適化したエラープローンPCRを実施し、変異ライブラリーを作製した。FcRの生産性および耐酸性を指標にスクリーニングすることで、安定性向上株を取得した。取得した安定性向上株のFcR配列を解析し、安定性向上に寄与するアミノ酸置換位置および種類を同定し、それぞれで得られたアミノ酸置換を組み合わせることで安定性向上株を作製した。さらに安定性向上株を鋳型に変異ライブラリーを作製し、高生産性、高耐酸性を指標としたスクリーニングを繰り返すことで、安定化FcRを作製した。得られた安定化FcRは複数個のアミノ酸が置換され、天然型と比較して大きく耐酸性が向上し、pH 3.0の酸性条件下、100時間以上浸漬した後でも抗体

結合活性を十分に保持していた^{13,14)}。

3. 安定化FcRの生産 安定化FcR生産用大腸菌を高密度培養法により培養した。独自処方による動物由来原料不使用の培地を使用し、溶存酸素濃度により追加培地量を制御する培養法を用いて、大腸菌を濁度(OD₆₀₀)150以上の高密度に増殖させた。IPTGを用いた発現誘導により、安定化FcRは培養液あたり1 g/L以上の高濃度に生産された。

高密度培養液を回収後、遠心分離により培養上清を除去し、FcR発現大腸菌菌体を回収した。界面活性剤や酵素などを用いた薬剤による抽出により安定化FcRを抽出した後、遠心分離、フィルターろ過により清澄な抽出液を得た。

抽出液のpH、電気伝導度を調整し、イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて精製することで、高純度安定化FcRを取得した。イオン交換ゲルとして、TOYOPEARL[®] CM-650Mを使用し、2段階の塩濃度で洗浄後、溶出することで、1ステップのカラムクロマトグラフィーのみで高純度、高収率にて安定化FcRを精製することが可能となった¹⁵⁾。精製に用いるゲルや器具をNaOHによりアルカリ洗浄した後、脱エンドトキシン水で十分に洗浄し、使用する緩衝液も脱エンドトキシン水を使用することで、陽イオン交換クロマトグラフィーにより大腸菌の細胞膜に含まれる発熱成分(エンドトキシン)を効率的に除去でき、各種分析結果も規格値を満たすことを確認した¹⁵⁾。

4. FcR固定化分離剤の分離性能評価 精製された安定化FcRをリガンドとして使用し、独自の固定化タグ配列を活用することで配向性を制御して、官能基を変換・修飾した分析用分離基材に固定化した。FcR固定化分離剤をφ4.6 mm × 75 mmのカラムに充填し、FcRカラムを作製した。FcRカラムの分離性能評価として、表1の条件(分析条件の一例)を用いて抗体医薬品の分析を実施した。抗体医薬品として市販されているリツキサン[®]を使用した。通常のSEC分析カラム(TSKgel[®] G3000SW_{XL})を用いた分析では単一ピーク(図1A)であった抗体医薬品が、開発したFcRカラムによる分析では図1Bのように、複数のピークに分離することが判明した。これは、抗体に付加している糖鎖の構造には多様性があり、その構造の違いによって抗体とFcRとの結合性が異なることから、溶出時間が異なっていることを表している。すなわち、FcRは抗体に付加する糖鎖構造によって結合親和性が異なり、分離剤表面上で抗体を保持する結合力が異なることから、図1Bのような分離パターンが得られると考えている。

表1. クロマトグラフィー条件

レジン	組換え Fcγ Receptor IIIa 固定化レジン
カラム	φ4.6 mm × 75 mm (容量 1.2 mL)
緩衝液 A	50 mM Citrate buffer (pH 6.5)
緩衝液 B	50 mM Citrate buffer (pH 4.5)
流速	1.0 mL/min.
溶出	0–2 min.: 0%B, 2–20 min.: 0–100%B, 20–25 min.: 100%B
検出	Absorbance at 280 nm
サンプル	抗体量 5 μg

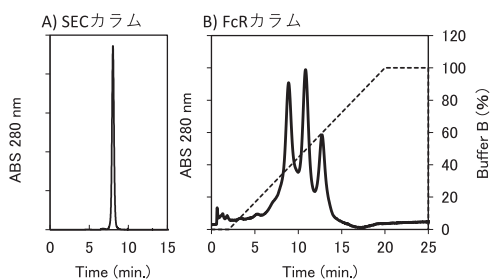


図1. 抗体医薬品の分離例。A) SEC カラム, B) FcR カラム。

また、精製された抗体のみならず、抗体産生細胞の培養上清液を直接分析することも可能である。培養液成分はFcRカラムには吸着せず素通りし、培養液に含まれる抗体成分のみが吸着し、分析することが可能である。

5. 分離フラクションの糖鎖構造解析 FcRカラムにより分離した抗体の各フラクションをピークごとに収集し、そのフラクションに含まれている抗体の糖鎖構造を解析した。その結果、図2のように、溶出時間の早い成分には、糖鎖構造の末端にガラクトースのないものが多く、溶出時間の遅い成分にはガラクトースが多くついたものが含まれるなどの特徴が見いだされた。また、他にも糖鎖構造により、各フラクションに含まれる量やその組成比が異なることが判明した。すなわち、FcRと抗体の親和性が抗体に付加する糖鎖構造により変化することが確認された。

6. 分離フラクションの抗体活性 (ADCC 活性) 評価 さらにFcRカラムにより分離された各フラクションに含まれる抗体のADCC活性を測定した結果を図3に示した。FcRカラムにより分離された各フラクションは溶出時間に応じたADCC活性の違いを示した。すなわち、溶出時間の早いフラクションはADCC活性が低く、溶出時間の遅いフラクションはADCC活性が高いことが判明した。これらの結果から、FcRと抗体の結合

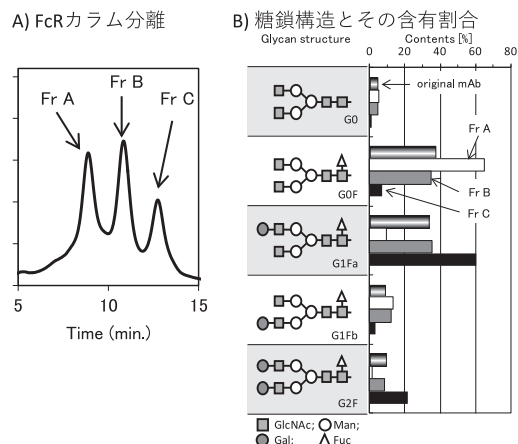


図2. FcR カラム分離画分の糖鎖構造解析

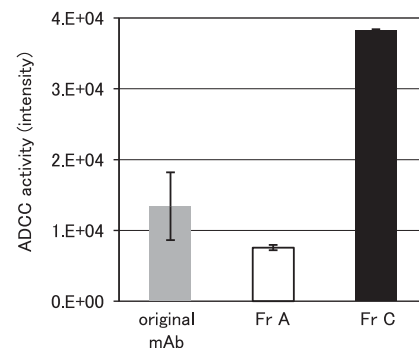


図3. FcR カラム分離画分のADCC活性測定

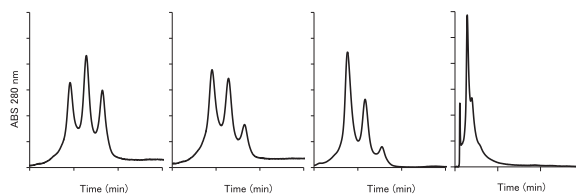


図4. FcR カラムによる各種抗体医薬品の分離例

親和性の強弱とADCC活性の強弱が相関し、抗体に付加する糖鎖の構造がその結合親和性に影響することが確認された。特に、糖鎖構造末端のガラクトースの有無によるADCC活性の違いは図3より推察できるが、一方で、その他の糖鎖構造の影響については確認できていない。

7. 各種抗体医薬品の分離例 数種類の抗体医薬品を同様に分析した分離パターンの結果を図4に示した。抗体医薬品の種類によって、FcRカラムの分離パターンが異なることが判明した。これはFcRカラムが示す分離パターンの違いが、糖鎖構造の違いなどを反映し、各抗体医薬品の活性 (ADCC 活性) の指標となっていることを表している。たとえば、抗がん剤であれば、より

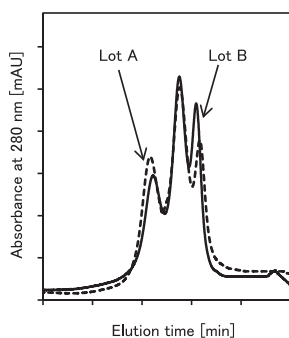


図5. FcRカラムによる同一抗体医薬品のロット間差分析

強い細胞殺傷能力が必要であることからより強いADCC活性を保持していることが望まれる。一方、阻害（中和）作用を中心とした抗体医薬品では、自己細胞を殺傷する作用は弱い方が良いと考えられるので、ADCC活性が弱いものが望まれる。FcRカラムからの溶出時間が遅い画分は、FcRと強い結合を持つ糖鎖構造を含んだ抗体画分であり、生体内のFcRの主な機能である免疫活性化に伴う細胞を殺傷する能力（ADCC活性）が強い抗体成分を含んでいると考えられる。逆に、FcRカラムからの溶出時間が早い、もしくは結合しない画分は、FcRと結合力が弱い糖鎖構造を含んだ抗体画分であり、細胞を殺傷する能力（ADCC活性）が弱い抗体成分を含んでいると考えられる。

また、図5に同じ抗体医薬品でも、ロット違いの抗体医薬品の分析例を示したが、同じ抗体医薬品でも製造ロットが異なると分離パターンが若干異なることが示され、抗体に付与する糖鎖構造の比が異なることが示唆された。

まとめ

以上のように、ヒトの免疫機構の一翼を担うFc受容体を利用した抗体医薬品分析用のカラムを開発してきた。FcRカラムは、抗体とFcRとの結合力の違いから、抗体医薬品の糖鎖構造に基づく分離が可能であることを確認できた。さらに、FcRと抗体医薬品の結合の強さが抗体医薬品のADCC活性にも寄与していることから、FcRカラムを用いることで簡便に抗体医薬品の活性を測定できることが確認できた。本開発品は、FcRを人工的に改良、分離剤表面に固定化させることで、抗体の糖鎖

構造による結合性の違いといったFcRのヒト生体内での本来の働きを保持させ、抗体医薬品の分離を可能とした。

本開発品のFcRカラムは、抗体医薬品の創薬研究や、生産技術の開発における分析、生産された原薬や製品の品質管理など、さまざまな場面での適応が可能である。創薬研究では、最適なADCC活性を示す糖鎖構造を有する抗体を産生するような細胞の選別などに、生産技術開発では、所望の強さのADCC活性を有する糖鎖構造となるよう培養プロセスにおける培養パラメーターの最適化、精製プロセスの最適化などに使用可能である。さらに製造途中の工程分析としてもADCC活性および糖鎖構造をモニターすることが可能であり、品質管理では、生産された抗体の規格値の一部としてADCC活性の確認に利用が可能である。

謝 辞

本研究開発の一部は、経済産業省の「平成25年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」及び「平成26年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術）」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の課題番号（JP17ac0101003）の支援によって行われた。

文 献

- 1) 日経バイオテック 編：日経バイオ年鑑2019, p. 162, 日経BP社 (2018).
- 2) 石井明子, 津本浩平: *Yakugaku Zasshi*, **137**, 815 (2017).
- 3) Satoh, M. *et al.*: *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **18**, 129 (2006).
- 4) Shields, R. L. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **277**, 26733 (2002).
- 5) Shinkawa, T. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **278**, 3466 (2003).
- 6) 設楽研也: *Yakugaku Zasshi*, **129**, 3 (2009).
- 7) Ishii, T. *et al.*: *Clin. Cancer Res.*, **129**, 1520 (2010).
- 8) Carter, P.: *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 118 (2001).
- 9) 寺尾陽介ら: 東ソー研究・技術報告, **58**, 35 (2014).
- 10) Uniprot: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08637> (2019/4/11).
- 11) Leung, D. W. *et al.*: *Techniques*, **1**, 11 (1989).
- 12) 特開2016-183113
- 13) Terao, Y. *et al.*: PREP2016 Symposium Poster #P-T-213
- 14) Terao, Y. *et al.*: PREP2017 Symposium Poster #P-T-234
- 15) 寺尾陽介ら: 東ソー研究・技術報告, **61**, 33 (2017).