

博士論文（要約）

医薬品開発を指向した糖鎖修飾に関する
抗体の物性解析

江頭 由里子

【緒言】抗体医薬品市場は拡大を続けており、現在開発段階にある抗体医薬品の数は500を超え、そのほとんどがIgG型である。IgGは2つの重鎖および2つの軽鎖が結合して構成されるヘテロ4量体のタンパク質であり、重鎖中の特定のアスパラギン（N297）に一对のN型糖鎖が結合している。抗体のN型糖鎖パターンは抗体の安定性、生物活性および免疫原性等に影響を与えることが知られている。中でも、抗体医薬の主要な作用機序の一つである抗体依存性細胞傷害活性（ADCC活性）は、糖鎖構造の影響を大きく受ける。例えば、N型糖鎖還元末端のNアセチルグルコサミンからフコース残基を除去するとADCC活性が100倍以上に向上することが明らかになっており、臨床効果を高めるための糖鎖改変がなされた抗体医薬の開発が盛んに行われている。その一方で、中和抗体やアゴニスト抗体、アンタゴニスト抗体を用いた抗体医薬においてはADCC活性が不要あるいは望ましくない場合があり、糖鎖を欠如させることでADCC活性を消失させた抗体の利用が検討されている。しかしながら、糖鎖が付加しないアミノ酸変異体や酵素処理により糖鎖を完全に除去した抗体では、熱安定性が顕著に低下することや凝集性が増加することが報告されている。上述したように、糖鎖構造は抗体医薬の性能に大きな影響を与えることから、高機能、高品質な医薬品用抗体を開発するためには、抗体の糖鎖構造の最適化が重要であると考えられる。

これまで医薬品用抗体の産生にはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞が最も多く用いられてきたが、コストの面から、酵母、植物および昆虫細胞等を用いた抗体の産生が検討されている。動物、ヒト、植物、昆虫はそれぞれ特有の糖鎖プロセッシング機構を持ち、異なる糖鎖パターンのタンパク質を産生する。そこで、糖転移酵素の共感染により簡便に糖鎖改変体を産生できるカイコバキュロウイルス発現系を用いることによって、カイコで発現させるタンパク質の糖鎖修飾パターンをヒト型、動物型に改変する研究が進められている。

本研究は、抗体の安定性および機能に大きな影響を与えることが知られる抗体の糖鎖構造に着目して、カイコバキュロウイルス発現系由来抗体の医薬品適用についての可能性を評価することを目的とした。

【実験】

3つの異なる可変領域を持つ抗体（抗 Her2 抗体、抗 IL-8 抗体、抗 IL-12 p40 抗体）を、カイコバキュロウイルス発現系、および CHO 細胞発現系を用いて発現させた。また、カイコバキュロ発現系を用いて、糖転移酵素発現ウイルスと抗体発現ウイルスを混合して接種することにより糖鎖改変抗体を発現させた。発現した各種抗体は proteinA 親和性クロマトグラフィー等を使用して精製した後、糖鎖パターンの解析と、熱安定性、凝集性および ADCC 活性の評価を行った。

糖鎖パターン解析

糖鎖解析を行った結果、同一の発現系では糖鎖パターンは3つの抗体間で非常に類似しており、カイコバキュロウイルス発現系由来抗体では、昆虫型として知られる少マンノース型、CHO

細胞由来抗体では、動物型として知られる N-アセチルグルコサミン型糖鎖が主に検出された。また、カイコバキュロウイルス発現系において N-アセチルグルコサミン転移酵素を共感染させることにより取得した糖鎖改変抗体では、動物型として知られる N-アセチルグルコサミン結合型糖鎖の割合が増加していた。

糖鎖改変抗体間で糖鎖パターンを比較すると、N アセチルグルコサミン結合型糖鎖の割合が多い順に、抗 IL-8 抗体 (79.0%)、抗 IL-12 p40 抗体 (54.7%)、抗 Her2 抗体 (33.9%) であった。また、ADCC 活性に大きな影響を及ぼすフコース残基を持たない糖鎖の割合も同じく、抗 IL-8 抗体 (28.2%)、抗 IL-12 p40 抗体 (23.8%)、抗 Her2 抗体 (15.0%) の順であった。このことから、糖鎖改変効率が高くなるほど、フコース残基を持たない糖鎖の割合も増加する可能性が示唆された。

熱安定性評価

熱安定性評価には示差走査蛍光測定 (DSF)、示差走査熱量測定 (DSC) を用いた。DSF の結果、すべての抗体において CH2 の変性温度 (T_m) が CHO 細胞発現系、糖鎖改変カイコバキュロウイルス発現系、カイコバキュロウイルス発現系の順に高く、少マンノース型の非還元末端に N アセチルグルコサミンが付加することより安定性が向上することが示唆された。

DSF と DSC の結果を比較すると、DSF においてはすべてのクローンにおいて、糖鎖改変によって増加した N アセチルグルコサミンの割合と CH2 ドメインの T_m 値に相関が見られたが、DSC においては、抗 IL-8 抗体で DSF の結果と異なる現象が見られた。抗 IL-8 抗体のカイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体は N アセチルグルコサミン結合型糖鎖の割合が約 80% であり、CHO 細胞由来抗体と糖鎖パターンがほぼ同じであることが予想されるが、CH2、Fab の両ドメインの変性温度は通常のカイコバキュロウイルス発現系由来抗体とほぼ同等で、CHO 細胞由来抗体よりも 5°C 程度低いことが明らかになった。糖鎖構造の差異により Fab ドメインの変性温度に変化が見られないことが多数報告されていることや、抗 IL-8 抗体は CH2 ドメインにしか糖鎖付加部位を持たないことから、この熱安定性の違いは糖鎖構造が原因でない可能性が高いと考えられる。

凝集性評価

凝集解析はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)、動的光散乱 (DLS) を用いて行った。抗 Her2 抗体および抗 IL-12 p40 抗体の酸暴露による凝集性を評価した結果、カイコバキュロウイルス発現系由来抗体と CHO 細胞由来抗体は同様の凝集プロファイルを示したことから、少マンノース型糖鎖を有する抗体と N アセチルグルコサミン型糖鎖をもつ抗体では酸による凝集性が同等であることが示唆された。

抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC 活性)

レポーターアッセイ法により ADCC 活性を評価した結果、抗 Her2 抗体と抗 IL-12 p40 抗体

において、カイコバキュロウイルス発現系由来抗体と CHO 細胞由来抗体の活性は同程度であったが、カイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体の活性はカイコバキュロウイルス発現系由来抗体よりも上昇していた。

フコース残基をもたない糖鎖では、N-アセチルグルコサミン結合型糖鎖を持つ抗体は、少マンノース型糖鎖をもつ抗体よりも ADCC 活性がわずかに高いことが報告されていることから、N アセチルグルコサミン結合型への糖鎖改変と、糖鎖改変に伴うフコシル化糖鎖の減少により、ADCC 活性が向上したと考えられる。

【結言】

本研究において、カイコバキュロウイルス発現系を用いて抗体発現ウイルスと糖転移酵素発現ウイルスを共感染することにより、3種類の可変部の異なる抗体すべてでNアセチルグルコサミン結合型の糖鎖改変抗体の作製に成功した。糖転移酵素発現ウイルスと抗体発現ウイルスの混合液をカイコに接種するだけで、最大約80%の糖鎖改変体が得られることから、他の糖鎖改変方法と比較して簡便・高効率であり、非常に優れた糖鎖改変方法であると言える。

カイコバキュロウイルス発現系由来抗体の安定性について評価した結果、熱安定性は CHO 細胞由来抗体にわずかに劣るものの、凝集性は同等であった。また、糖鎖改変により熱安定性の向上が可能であることが示唆された。しかし、カイコバキュロウイルス発現系由来抗体の熱安定性が、糖鎖構造以外の影響を受けている可能性が強く示唆され、カイコバキュロウイルス発現系と CHO 細胞発現系に関して糖鎖修飾以外の翻訳後修飾の有無や両者のタンパク質の生産における品質管理機構について調査する必要があると考えられる。

抗体の機能については、過去の報告と同様に、抗原結合活性が糖鎖の影響を受けないことが確認された。また、カイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体の ADCC 活性が、通常のカイコバキュロウイルス発現系由来抗体、CHO 細胞由来抗体よりも高いことが示され、糖転移酵素の共感染によるフコシル化糖鎖の減少および N アセチルグルコサミン結合型糖鎖の増加が ADCC 活性向上に寄与していることが示唆された。

今後の課題として、カイコバキュロウイルス発現系由来抗体の安定性を動物細胞由来抗体と同等以上に向上させるためには、糖鎖修飾以外に安定性に影響を与える因子を明らかにすることが必要であると考えられる。また、カイコバキュロウイルス発現系由来糖鎖改変抗体の糖鎖改変が抗体クローンにより大きく異なることから、糖鎖改変効率をコントロールする方法の開発が望まれる。それらの課題を解決することにより、カイコバキュロウイルス発現系は、迅速、高発現という特徴を生かした医薬品用抗体の産生系としての実用化が期待できる。