

タンDEM Fc 化による抗体依存性細胞傷害活性の増強

長島 弘明,^{*,a,b} 増保安 彦^a

Enhancement of Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity by Tandem Fc Multimerization

Hiroaki NAGASHIMA^{*,a,b} and Yasuhiko MASUHO^a^aTokyo University of Science, Yamazaki 2641, Noda, Chiba 278–8510, Japan, and ^bBio-Product Technology Research Department, Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., 5–5–1 Ukima, Kita-ku, Tokyo 115–8543, Japan

(Received August 29, 2009)

Monoclonal antibodies are being used as therapeutics for a number of cancers, such as leukemia, breast and colon cancers, and a lot of monoclonal antibodies specific for tumor-related antigens have been on clinical trials. Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is one of the major mechanisms by which antibodies exert anti-tumor effects. ADCC occurs through interaction between the Fc domains of IgG antibodies bound to target cells and Fc γ receptors on the surface of effector cells. In our study, a chimeric antibody, designated M-Ab, was constructed with the V regions from mouse anti-CD20 mAb 1F5 and the C regions from human IgG1 and κ chain. Two or three Fc domains were tandemly repeated downstream of the C-terminus of the M-Ab to give D0-Ab (Fc dimer Ab without a linker), T0-Ab (Fc trimer Ab without a linker), and T3-Ab (Fc trimer Ab with a (GGGGS)₃ linker in front of the second and third hinge regions). Here, we show that Fc tandem repeat antibodies bind to all the low-affinity Fc γ receptors with very potent avidities and have greatly enhanced ADCC activity. T3-Ab is about 100 times more potent than the parental 1F5 chimeric antibody in terms of both Fc γ receptor binding and exerted ADCC activity at a 50–100 times less concentration as compared with the parental antibody. Thus, Fc tandem repeat antibodies are anticipated to be candidates for anti-tumor therapeutics and useful tools to elucidate the biological roles of Fc γ receptors.

Key words—antibody-dependent cellular cytotoxicity; Fc tandem repeat antibody; Fc γ receptor; linker; CD20

1. はじめに

1986年に世界で初めての抗体医薬品が登場して以来、抗体を医療に応用するための研究開発が世界で行われてきた。現在、世界全体では20品目以上の抗体医薬品が使用されており、臨床試験の段階にある抗体医薬品の数は100を超える。このような近年の抗体医薬の急速な普及は、少なくとも2つの技術革新よりもたらされた。1つ目は、任意の抗原に対する抗体が獲得できるようになった細胞融合法の確立である。生体内で抗体を産生するB細胞には寿命が存在し、無制限に培養することができない。

1975年、KohlerとMilsteinらは、B細胞をがん細胞と融合する方法を確立し、抗体を産生する性質と寿命を持たない性質を併せ持つハイブリドーマを作

成することに成功し、これにより単一の特異性と均一の構造を持つモノクローナル抗体を無制限に供給できるようになった。¹⁾ 特異的に抗原タンパク質と結合する性質を持つモノクローナル抗体は、診断や検査、研究などの幅広い分野で用いられるようになった。それと同時に、当然、医薬品としての応用研究も世界中で進められたが、医薬品としてのモノクローナル抗体は十分な効果がほとんど得られなかった。その大きな理由はモノクローナル抗体を投与した際に、その免疫原性から出現する中和抗体によるものであり、中和反応により薬剤効果が著しく低下したり、抗原抗体反応によるアレルギーが起きたりして治療が継続できなくなることが多かった。結局、医薬品化に成功した初期のモノクローナル抗体は、初めての抗体医薬品でもあるムロモナブ-CD3のみであった。²⁾ このような問題を克服したのが、2つ目の技術革新である遺伝子工学技術の進歩であった。マウスV領域とヒトC領域を持つマウス/ヒトキメラ抗体や、抗原と直接結合する相補性決定領域

^a東京理科大学 (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641),

^b中外製薬株式会社生物技術研究部 (〒115-8543 東京都北区浮間 5-5-1)

*e-mail: nagashimahra@chugai-pharm.co.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムGS3で発表したものを中心に記述したものである。

のみがマウス由来であるヒト化抗体は、ヒト投与時の異種抗体産生が著しく低下するだけでなく、血中半減期延長に加えて抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 活性や補体依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity; CDC) 活性などが増強した。^{3,4)} これらの技術によって生み出された抗体医薬品の市場は急速に拡大しており、2008年の抗体医薬品市場は、世界全体で300億ドルを超え、国内でも2007年比で50%以上増加して1000億円を超えた。^{5,6)} このように世界中で用いられている抗体医薬であるが、現在でも大きな課題を抱えている。抗体は複雑な構造を持つタンパク質であるため、生産には動物細胞を培養するための特別な設備が必要となり、また、投与量が多いために基本的に薬剤費が高額となってしまう。現在の抗体医薬品の奏効率はかならずしも高くないことから、より高活性、低濃度で効果を示す次世代抗体、すなわち、さらなる技術革新が求められている。

2. 抗体医薬品の主な作用機序とADCC活性

抗体医薬品の作用機序は多岐にわたる。あるリガンド分子が疾患に重要な役割を持つ場合に、その分子に結合して機能を失わせる作用を中和活性といい、抗TNF α 抗体インフリキシマブや、抗VEGF抗体ベバシズマブなどが挙げられる。また、抗IL-6受容体抗体トシリズマブのように、リガンドではなく、受容体側に結合することでリガンドの結合を競合的に阻害するものもある。そして、抗CD20抗体リツキシマブや抗HER2抗体トラスツズマブのように、がん細胞の細胞膜上に発現している抗原に結合し、ヒトの免疫機構を利用してがん細胞を傷害する、いわゆるADCC活性、CDC活性を主要な作用機序とするものがある (Fig. 1)。ADCC活性は、抗体に覆われた標的細胞が、抗体のFc部分と結合するFc受容体を持つエフェクター細胞により傷害される機構で、Fc γ 受容体IIIaを持つナチュラルキラー細胞が重要なエフェクター細胞として知られている。Fc γ 受容体IIIaには158番目のアミノ酸に遺伝子多型が確認されており、バリニン型 (V158) とフェニルアラニン型 (F158) が存在するが、バリニン型Fc γ 受容体IIIaは、フェニルアラニン型Fc γ 受容体IIIaよりもヒトIgG1のFc部分と強く結合することが明らかにされている。⁷⁾ また、リツ

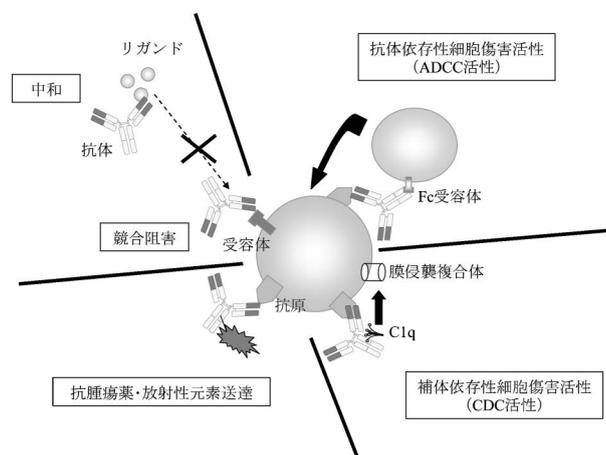


Fig. 1. The Mechanisms of Antibody Therapeutics

キシマブの臨床試験において、バリニン型ホモ接合体患者の方がフェニルアラニン型Fc γ 受容体IIIaを持つ患者よりも抗腫瘍効果が優れていた。⁸⁾ これは、リツキシマブの作用機序としてADCC活性が重要であることを示している。同様に、トラスツズマブやセツキシマブにおいてもFc γ 受容体IIIaの遺伝子多型の違いによる効果の違いが臨床試験で示されており、ADCC活性の重要性はますます注目され、より高いADCC活性を持つ抗体の研究が期待されている。^{9,10)}

3. タンデムFc型抗体

3-1. タンデムFc型抗体とは 抗体のFc領域のアミノ酸を改変したり、¹¹⁾ Fc領域中に存在する糖鎖を改変することでFc γ 受容体IIIaへの結合力を上昇させてADCC活性を高めた報告がなされている。¹²⁻¹⁴⁾ これらは、ADCC活性を高めるためにはFc γ 受容体、特にFc γ 受容体IIIaに対する結合力を高めることが重要であることを示唆している。私たちは、アミノ酸改変や糖鎖改変とは全く異なった方法でFc受容体に対する抗体の結合力を上昇させようと試みた。IgGは、2本のH鎖のヒンジ領域からCH2ドメインにまたがる部分でFc γ 受容体IIIaに結合することが知られている。¹⁵⁾ 私たちは、



長島弘明

2006年に東京理科大学大学院薬学研究科修士課程を修了し、同年、中外製薬株式会社に入社。現在は中外製薬株式会社製薬本部製薬研究部 (生物技術) に在籍し、東京理科大学大学院薬学研究科博士後期課程2年に在学中。研究テーマは、改変による抗体の高活性化。

Fc 受容体に対する結合力を上昇させるべく、抗体の Fc 領域と Fc 受容体の間に多価結合の概念を取り入れるため、IgG1 抗体の Fc 部分をタンデムに二量体化、又は三量体化した改変抗体を作製した (Fig. 2)。多価による結合力は avidity と呼ばれ、1 価による親和性 affinity とは区別され、一般に飛躍的に強力な結合を示す。今回は、これらタンデム Fc 型抗体について機能を評価した結果について報告する。

3-2. タンデム Fc 型抗体の調製 タンデム Fc 型抗体の標的抗原はヒト CD20 とした。マウス抗ヒト CD20 抗体を産生するハイブリドーマ 1F5 細胞から、RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を調製した後、L 鎖の V 領域遺伝子と H 鎖の V 領域遺伝子を、それぞれベクターにクローニングした。L 鎖の V 領域遺伝子の下流にはヒト κ 鎖 C 領域遺伝子を組み込んでキメラ抗 CD20 L 鎖遺伝子とし、

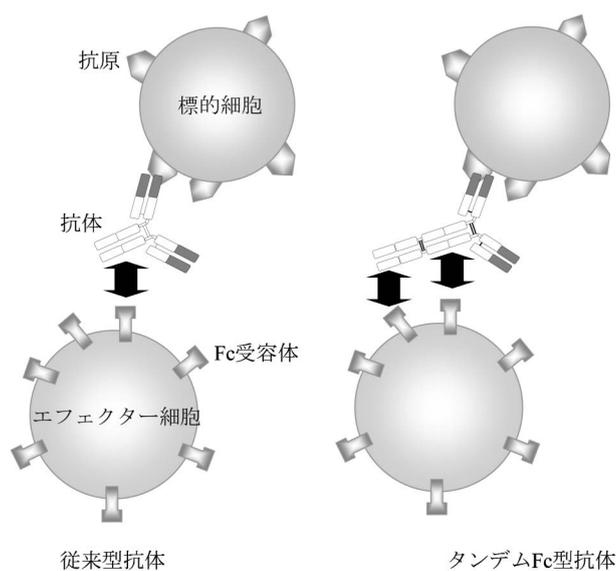


Fig. 2. The Concept of Tandem Fc Antibodies

H 鎖の V 領域遺伝子の下流にはヒト IgG1 の C 領域遺伝子を組み込んでキメラ抗 CD20 H 鎖遺伝子 M-H とした。M-H 遺伝子のさらに下流に、IgG1 のヒンジから CH3 ドメインの配列をタンデムに挿入し、Fc 二量体 H 鎖遺伝子 D-H 及び Fc 三量体 H 鎖遺伝子 T0-H を構築した。Fc 三量体 H 鎖遺伝子では、タンデムに連結した Fc と Fc の間に柔軟性を与える目的で、グリシン 4 残基とセリン 1 残基が 3 回繰り返された配列を持つ、計 15 アミノ酸で構成される (GGGGS)₃ リンカーを挿入した Fc 三量体 H 鎖遺伝子 T3-H も作成した。これらの H 鎖遺伝子を L 鎖遺伝子とともに発現させることで、Fig. 3 のような Fc 領域をタンデムに複数持つ抗体が産生されることを期待した。L 鎖遺伝子と H 鎖遺伝子を発現するベクターを CHO-DG44 細胞に遺伝子導入した後、G418 とメトトレキサートによって薬剤選抜し、さらに限界希釈法による細胞のクローニングを経て、それぞれの抗体を安定発現する細胞株を作成した。抗体安定発現細胞を無血清培地に馴化し、無血清培地中で培養して得られた培養上清から、プロテイン A アフィニティークロマトグラフィーによって粗精製し、さらにゲル濾過クロマトグラフィーで分離することで凝集体や分解物を除去し、それぞれの抗体を精製した。タンデム Fc 化によって発現される抗体は分子量が大きくなっているが、安定発現株の構築中にそれぞれの抗体発現株間で細胞増殖等に著明な違いは確認されず、抗体の産生量に関しても大きな違いはみられなかった。

3-3. タンデム Fc 型抗体の定性 精製した抗体を、還元条件では 10% ポリアクリルアミドゲル、非還元条件では 6% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE によって分離し、定性確認を行った。還元条件では、H 鎖と L 鎖がそれぞれ単独

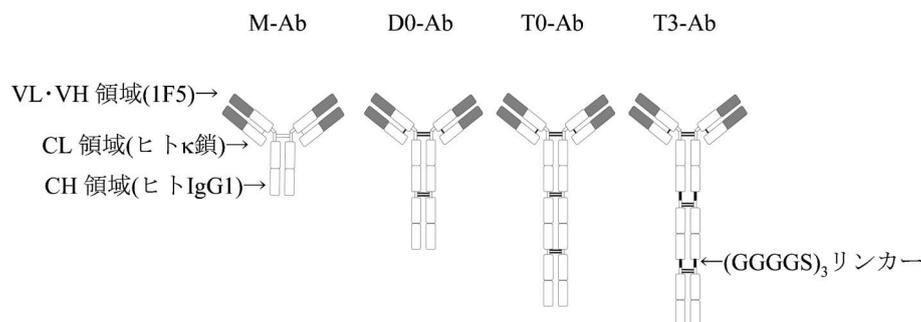


Fig. 3. Schematic Structures of M-Ab, D0-Ab, T0-Ab and T3-Ab

で確認されるはずである。L鎖、H鎖はそれぞれ約 25 kDa, 50 kDa であり、H鎖のヒンジ部分からC末端までは約 25 kDa である。結果として、Fc 単量体抗体、Fc 二量体抗体、Fc 三量体抗体の L鎖を約 25 kDa に、それぞれの H鎖を約 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa に検出したことから、H鎖、L鎖はともに適切に発現していると言える [Fig. 4(A)]。また、非還元条件ではジスルフィド結合が開裂しないため、抗体の大まかな全体構造を確認することができる。非還元条件では、Fc 単量体抗体、Fc 二量体抗体、Fc 三量体抗体のそれぞれについて約 150 kDa, 200 kDa, 250 kDa の位置に検出したことから、それぞれの抗体は H鎖 2 分子、L鎖 2 分子から構成されていると考えられ、タンデム Fc 型抗体が天然の抗体と同様にヘテロ四量体の構造をとっていることが確認できた [Fig. 4(B)]。

3-4. タンデム Fc 型抗体の CD20 結合性 タンデム Fc 型抗体の CD20 抗原への結合力を、CD20 陽性 Ramos 細胞を用いてフローサイトメトリーで測定した。Ramos 細胞を FACS Buffer (0.1% ウシ血清アルブミン, 0.02% アジ化ナトリウム, pH 7.4 リン酸緩衝生理食塩水) で懸濁して 30 分間氷上でブロッキングした後、それぞれの抗体を最終濃度が 50 nmol/l となるように添加して氷上で 30 分反応させた。細胞を十分に洗浄した後、フルオレセイン標識ヤギ抗-ヒト κ 鎖抗体を加え、氷上で 30 分間遮光して静置した。再び細胞を洗浄した後、フローサイトメトリーを用いてそれぞれの抗体の CD20 に対する結合性を測定した。結果として、それぞれの抗体が Ramos 細胞に特異的に結合してい

ることが確認されたが、その結合力はタンデム Fc 型抗体では Fc 単量体抗体に比べて 1/3 程度に弱くなっていることがわかった (Fig. 5)。

3-5. タンデム Fc 型抗体の Fc 受容体結合性 タンデム Fc 型抗体の Fc 受容体に対する結合力を、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) で測定した。Fc γ 受容体は、その機能によって細かく分類される。¹⁶⁾ Fc γ 受容体 IA は高親和性の活性型 Fc 受容体である一方で、Fc γ 受容体 IIA, Fc γ 受容体 IIIA は低親和性の活性型 Fc 受容体である。Fc γ 受容体 IA 及び Fc γ 受容体 IIA は貪食などの免疫活性に係わるとされる。Fc γ 受容体 IIB は低親和性で、唯一の抑制型 Fc 受容体である。Fc γ 受容体 IIA, Fc γ 受容体 IIB, Fc γ 受容体 IIIA (V158), Fc γ 受容体 IIIA (F158) の細胞外領域を 6x ヒスチジンタグ、グルタチオン-S-トラ

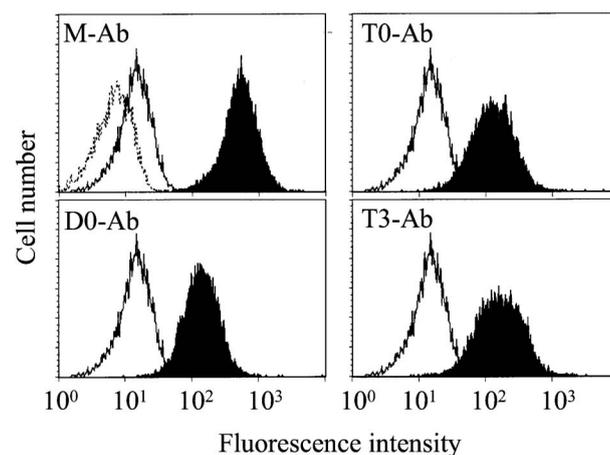


Fig. 5. CD20 Binding Activities of M-Ab, D0-Ab, T0-Ab and T3-Ab

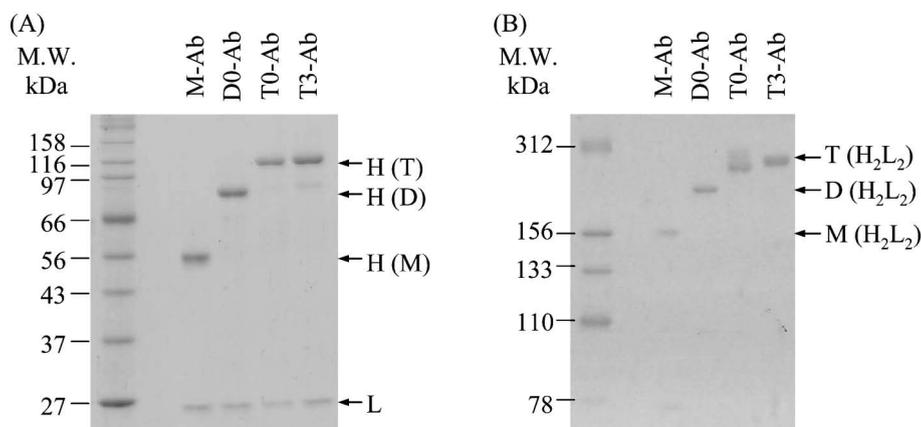


Fig. 4. SDS-PAGE Analysis of M-Ab, D0-Ab, T0-Ab and T3-Ab

ンスフェラーゼとの融合タンパク質として 293T 細胞を用いて作成した。それぞれの Fc γ 受容体を pH 7.4 リン酸緩衝生理食塩水で 4 μ g/ml に調整し、96 ウェル ELISA プレートに 4°C で一晩静置して固相化した。ELISA Assay Buffer (0.5% ウシ血清アルブミン, 2 mmol/l エチレンジアミン四酢酸, 0.05% Tween 20, pH 7.4 トリス緩衝生理食塩水) でプレートを 37°C で 2 時間ブロッキングした後、それぞれの抗体を添加し、さらに 37°C で 2 時間反応させた。ELISA Assay Buffer でウェルを洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト κ 鎖抗体を 37°C で 1 時間反応させた。洗浄後、0.4% *o*-フェニレンジアミン二塩酸塩, 0.003% 過酸化水素を含む pH 5.0 の 0.1 mol/l クエン酸ナトリウム緩衝液で発色させ、450 nm の吸光度を測定した。Fc γ 受容体 IIA, Fc γ 受容体 IIB, Fc γ 受容体 IIIA (V158), Fc γ 受容体 IIIA (F158) は低親和性であり、通常は天然の IgG1 単分子とはほとんど結合せず、標的細胞上の多数の抗原に対して複数の抗体が結合して免疫複合体を形成することで初めて結合できるようになる。しかし、タンデム Fc 抗体は Fc γ 受容体 IIA, Fc γ 受容体 IIB, Fc γ 受容体 IIIA (V158), Fc γ 受容体 IIIA (F158) の 4 種類の Fc 受容体に対して強力に結合することがわかった (Fig. 6)。結果として、Fc 三量体抗体は Fc 二量体抗体よりもすべての Fc γ

受容体に対して強力に結合し、Fc と Fc の間に (GGGGS)₃ リンカーが挿入されているほうが、より結合が強化されることがわかった。

3-6. タンデム Fc 型抗体の ADCC 活性 標的細胞として CD20 陽性 Ramos 細胞を、エフェクター細胞として健康人の血液からフィコール密度勾配遠心によって分離した末梢血単核球を用い、傷害された細胞から逸脱した乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase; LDH) を定量することで、タンデム Fc 型抗体の ADCC 活性を測定した。標的細胞である Ramos 細胞にそれぞれの抗体を 37°C, 5% CO₂ 条件下で 30 分反応させ、エフェクター細胞として末梢血単核球を加えて 37°C, 5% CO₂ 条件下で 4 時間反応させることで ADCC 活性を誘導した。反応後に培養液を回収し、培養液中の LDH を定量することで ADCC 活性を評価した。その結果、Fc 単量体抗体ではほとんど ADCC 活性を起ささないのに対し、タンデム Fc 抗体は強力な ADCC 活性を示した。Fc 三量体抗体では Fc 二量体抗体よりも ADCC 活性が強く、(GGGGS)₃ リンカーが挿入されている Fc 三量体抗体が最も強い ADCC 活性を誘導することができた (Fig. 7)。結果として、ADCC 活性は Fc γ 受容体に対する結合性と相関のある結果となった。特に T3-Mb の ADCC 活性の強化は、Ramos 細胞よりも CD20 抗原の発現が著

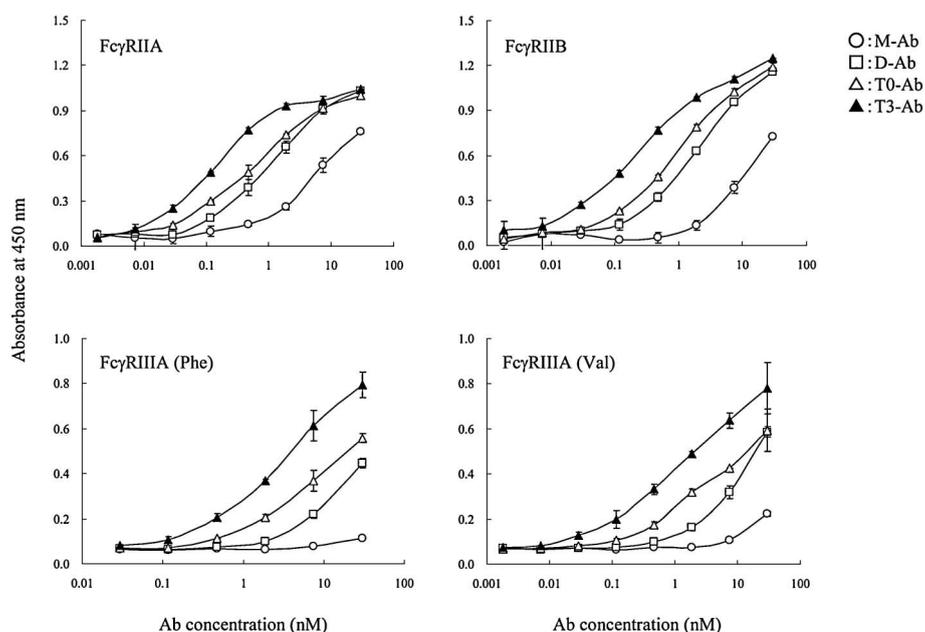


Fig. 6. Fc γ Receptor Binding Activities of M-Ab, D0-Ab, T0-Ab and T3-Ab

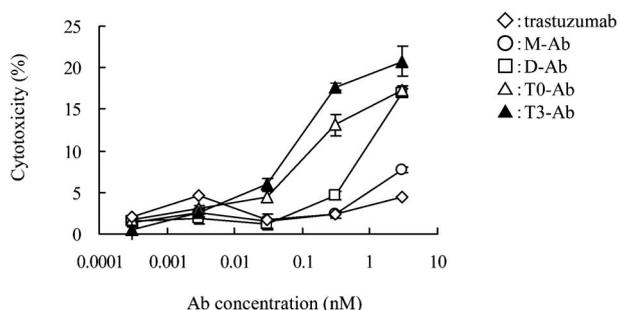


Fig. 7. ADCC Activities of M-Ab, D0-Ab, T0-Ab and T3-Ab

しく低い Namalwa 細胞を標的細胞としたときや、エフェクター細胞とした末梢血単核球の数を減らした場合でも達成され、従来の抗体に比べて、低濃度、低抗原、低エフェクター細胞数での ADCC 活性誘導の 3 つの点について優位性を示した。¹⁷⁾

4. おわりに

今回報告したように、タンデム Fc 型抗体は強力な ADCC 活性を示し、従来の抗体に比べて効果の増強や低濃度での効果発揮が期待される。また、タンデム Fc 化による Fcγ 受容体 IIA への結合力の増強によって、食食やサイトカイン分泌誘導も増強される可能性があり、^{18,19)} 現在も機能解析を進めているところである。抗体のタンデム Fc 化は、アミノ酸改変や糖鎖改変とは異なったエフェクター増強活性を有する改変抗体薬を提供する基盤技術として期待される。

REFERENCES

- 1) Kohler G., Milstein C., *Nature*, **256**, 495–497 (1975).
- 2) Emmons C., Hunsicker L. G., *Iowa Med.*, **77**, 78–82 (1987).
- 3) Morrison S. L., Johnson M. J., Herzenberg L. A., Oi V. T., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6851–6855 (1984).
- 4) Roguska M. A., Pedersen J. T., Keddy C. A., Henry A. H., Searle S. J., Lambert J. M., Goldmacher V. S., Blattler W. A., Rees A. R., Guild B. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 969–973 (1994).
- 5) TOP 20 Biologics 2008, “R&D Pipeline News,” La Merie Business intelligence, 2009.
- 6) “Nikkei Bio Nenkan 2009,” Nikkei Business Publications, Inc., Tokyo, 2008.
- 7) Koene H. R., Kleijer M., Algra J., Roos D., von dem Borne A. E., de Haas M., *Blood*, **90**, 1109–1114 (1997).
- 8) Cartron G., Dacheux L., Salles G., Solal-Celigny P., Bardos P., Colombat P., Watier H., *Blood*, **99**, 754–758 (2002).
- 9) Gennari R., Menard S., Fagnoni F., Ponchio L., Scelsi M., Tagliabue E., Castiglioni F., Villani L., Magalotti C., Gibelli N., Oliviero B., Ballardini B., Da Prada G., Zambelli A., Costa A., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 5650–5655 (2004).
- 10) Zhang W., Gordon M., Schultheis A. M., Yang D. Y., Nagashima F., Azuma M., Chang H. M., Borucka E., Lurje G., Sherrod A. E., Iqbal S., Groshen S., Lenz H. J., *J. Clin. Oncol.*, **25**, 3712–3718 (2007).
- 11) Shields R. L., Namenuk A. K., Hong K., Meng Y. G., Rae J., Briggs J., Xie D., Lai J., Stadlen A., Li B., Fox J. A., Presta L. G., *J. Biol. Chem.*, **276**, 6591–6604 (2001).
- 12) Umana P., Jean-Mairet J., Moudry R., Amstutz H., Bailey J. E., *Nat. Biotechnol.*, **17**, 176–180 (1999).
- 13) Shields R. L., Lai J., Keck R., O’Connell L. Y., Hong K., Meng Y. G., Weikert S. H., Presta L. G., *J. Biol. Chem.*, **277**, 26733–26740 (2002).
- 14) Shinkawa T., Nakamura K., Yamane N., Shoji-Hosaka E., Kanda Y., Sakurada M., Uchida K., Anazawa H., Satoh M., Yamasaki M., Hanai N., Shitara K., *J. Biol. Chem.*, **278**, 3466–3473 (2003).
- 15) Sonderrmann P., Huber R., Oosthuizen V., Jacob U., *Nature*, **406**, 267–273 (2000).
- 16) Takai T., *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 580–592 (2002).
- 17) Nagashima H., Tezuka T., Tsuchida W., Maeda H., Kohroki J., Masuho Y., *Mol. Immunol.*, **45**, 2752–2763 (2008).
- 18) Manches O., Lui G., Chaperot L., Gressin R., Molens J.-P., Jacob M.-C., Sotto J.-J., Leroux D., Bensa J.-C., Plumas J., *Blood*, **101**, 949–954 (2003).
- 19) Stanford M. M., Issekutz T. B., *J. Leukoc. Biol.*, **74**, 791–799 (2003).