



●抗体医薬品分析用 FcRn アフィニティカラムの開発

先端融合研究センター ライフサイエンス研究所 バイオプロセスグループ

井上 成彰
大嶽 遼子
湯本 達弥
廣野 琳子
寺尾 陽介

1. はじめに

抗体医薬品は病気の原因となる分子を特異的に標的とするように設計されたバイオ医薬品の一種であり、ガンやリウマチ等の治療薬として高い効果をもたらす。近年、抗体医薬品市場は著しい成長を遂げており、2022年度は前年度比32%増の29兆円を記録、2025年度で2022年度比59%増の46兆円、2030年度で75兆円にも達すると予想されている¹⁾。

抗体医薬品はその高い標的的特異性に加え、低分子医薬品に比べて長い血中半減期を有することから、少ない投与回数で長い効果が期待できるという利点を有している。抗体医薬品の長い半減期は、IgGのFc領域が胎児性Fc受容体(Neonatal Fc Receptor、以下FcRn)²⁾と呼ばれるタンパク質と相互作用することによってもたらされる。

FcRnは母子免疫に関与する受容体として同定されたタンパク質であるが、新生児期のみならず成体においても内皮細胞や上皮細胞を含む様々な組織の細胞表面に発現しており、IgGのリサイクリングやトランスサイトーシス等に関与していることが報告され、様々な側面でIgGの体内動態制御に関わっていることが明らかにされている³⁾。

ヒトFcRnはMHCクラスI分子に類似した構造を持ち、IgG receptor FcRn large subunit p51 (α 鎖)とBeta-2-microglobulin (β 鎖)の2つの異なるタンパク質がヘテロ二量体を形成し機能する⁴⁾。具体的には、FcRnは細胞内に取り込まれたIgGと弱酸性pH環境下のエンドソーム内で結合し、リソソームによる分解経路から保護する。その後、細胞外の中性pHで解離し、IgGを血中へリサイクルするという働きを担う^{5, 6)}。

近年では、IgGの血中動態に関与するFcRnとの親和性を指標とした次世代型抗体医薬品の開発が進んでいる。例えば発作性夜間ヘモグロビン尿症の治療薬で

あるユルトミリスは、IgGのFc領域を改変することでFcRnとの親和性を向上させ、血中半減期を延長させた医薬品であり、自己免疫性疾患の重症筋無力症の治療薬であるリステイーゴやウィフガートはIgGとFcRnとの結合を阻害することで血清中総IgG濃度を低下させる作用を有する医薬品である。

また、アルブミンもFcRnと相互作用することで血中半減期を延長しているタンパク質の一つであり⁷⁾、血友病B治療薬であるイデルピオンは、血液凝固第IX因子にアルブミンを融合することでFcRnを介したリサイクリング機構を利用し血中半減期を延長している。

一方、品質管理の観点からもFcRnは重要なタンパク質である。抗体の不均一性の要因にFc領域のメチオニン残基の酸化が挙げられる⁸⁾。酸化型抗体は免疫原性の原因となるだけでなく、FcRnとの親和性が低下することから血中動態が変化してしまうことが問題となっている^{9, 10)}。

現在、FcRnとの親和性を評価する手法として、SPR法やBLI法が知られているが¹¹⁾、解離定数等の物理化学的な解析が可能であるといった利点がある一方で、装置導入に伴う費用が高額であり、混合物サンプルについてはマクロな評価に留まるといった課題もある。

その課題に対する解決策として、我々はFcRnを固定化した抗体医薬品分析カラムを開発した。本カラムを用いることで、抗体医薬品開発において重要な受容体であるFcRnとの親和性を簡便に評価することが可能であり、近年成長を見せている抗体薬物複合体(ADC)や二重特異性抗体(BsAb)への適用も期待できる。本技術により抗体医薬品開発を加速することで、すべての人の健康と福祉に貢献することを目指している。

2. 方法

[1] FcRn 発現系の構築

ヒト IgG receptor FcRn large subunit p51 (Uniprot : P55899) および Beta-2-microglobulin (Uniprot : P61769) のアミノ酸配列情報を元に、FcRn の α 鎖細胞外領域をコードするポリヌクレオチド配列 (FcRn α 鎖遺伝子) および FcRn の β 鎖をコードするポリヌクレオチド配列 (FcRn β 鎖遺伝子) を設計し合成した。

設計した遺伝子をプラスミドベクター pET-26b (+) の T7 プロモーター下流に挿入し、発現用プラスミドベクター pET (FcRn α) および pET (FcRn β) を構築した。同様に α 鎖と β 鎖をペプチドリンカーで融合したタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を挿入した発現用プラスミドベクター pET (FcRn $\beta\alpha$) を構築した。

構築した発現用プラスミドベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、TB 培地での FcRn 生産量を評価した。

[2] 改良型 FcRn の創製

ヒト由来タンパク質である FcRn を大腸菌で生産することは困難であり、発現した FcRn が正しい立体構造を形成できずに不溶化することや、培養生産時の負荷により分解や凝集を引き起こすことなどが課題として挙げられる。そこで、培養生産時の環境において安定な変異体や、正しい立体構造を形成しやすい変異体を取得するため、ランダム変異導入による生産性向上変異体の取得を試みた。

天然型の FcRn 遺伝子をテンプレートとし、エラープローン PCR 法により FcRn をコードするポリヌクレオチドに変異を導入した FcRn 変異体ライブラリーを作製した。このライブラリーを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、FcRn 生産量を評価することで生産性の向上した変異体を選抜した。さらに、有効変異を組み合わせることで生産性の向上した改良型 FcRn を創製した。

[3] FcRn の生産

大腸菌を用いて異種タンパク質を発現する場合、大腸菌株やプラスミドベクターの塩基配列、大腸菌の培養条件や、取得した菌体から目的タンパク質の抽出・精製条件など種々の条件の最適化が必要である。

例えば、大腸菌とヒトではコドンの使用頻度が異なるため、コドンによっては翻訳効率が低下し発現量が制限されることが知られており¹²⁾、改良型 FcRn の

タンパク質配列を変えずに遺伝子をコードするポリヌクレオチドを変更することで生産性の向上が期待できる。また、非翻訳領域 5'UTR 配列はタンパク質の翻訳開始に関わり、リボソーム結合部位 (RBS) や mRNA の二次構造がタンパク質の生産性に影響を与える。さらにタンパク質の N 末端にシグナルペプチドを挿入することでタンパク質の分泌を促す方法も知られている。

ここでは創製した改良型 FcRn 遺伝子を挿入したプラスミドベクター pET (FcRn) について、FcRn をコードする塩基配列やシグナルペプチド、5'UTR 配列を変更したプラスミドベクターおよび各種大腸菌株を組み合わせ、FcRn 生産性を比較することで最も FcRn 生産に適した発現系を構築した。

構築した発現系について最適化した条件による高密度培養法を用い、FcRn を発現させた大腸菌の生産を行った。遠心分離により回収した FcRn 発現菌体に対して界面活性剤や酵素による抽出を行った後、カラムクロマトグラフィー精製により高純度な FcRn を取得した。

[4] FcRn アフィニティカラムの作製

当社独自のベース基材に固定化用官能基を導入し、精製した FcRn を固定化した。この際、カラム性能が向上するように固定化条件の最適化を実施した。作製した FcRn 固定化ゲルをカラムへ充填し、FcRn アフィニティカラム (以下、FcRn カラム) を作製した。

[5] FcRn カラムの評価

作製した FcRn カラムに各種抗体医薬品を通液し分析を実施した。pH 5.5 ~ 6.5 の弱酸性緩衝液条件で抗体医薬品を FcRn カラムに吸着させ、pH 7.4 ~ 8.5 の中性緩衝液へのグラジエント溶出により抗体医薬品を溶出させることで分離クロマトグラムを取得した。

3. 結果と考察

[1] FcRn 発現系の構築

設計した FcRn 遺伝子をプラスミドベクター pET-26b (+) に挿入し、発現用プラスミドベクター pET (FcRn α)、pET (FcRn β) を作製した。DNA シーケンス解析により、作製したプラスミドベクターの塩基配列が設計通りであることを確認した。

作製した発現用プラスミドベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、SDS-PAGE およびウエスタンブロッティングで FcRn の発現量を評価した

ところ、FcRnのβ鎖は可溶性画分に発現していることを確認できた。一方で、FcRnのα鎖は不溶性画分のみに発現しており、可溶性画分への発現は認められなかった。

そこで、α鎖とβ鎖をペプチドリンカーで融合したタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を挿入した発現用プラスミドベクター pET (FcRnβα) を作製¹³⁾、同様の方法で評価したところ、FcRnα鎖とβ鎖の融合タンパク質を可溶性画分に確認することができた。溶解度の高いβ鎖との融合によりα鎖の可溶化が促進されたと考えられる。

[2] 生産性向上 FcRn の創製

ランダム変異導入による生産性向上変異体取得のため、天然型のヒト FcRn 遺伝子をテンプレートとし、FcRn 遺伝子中に 2～3 個の塩基変異が導入されるよう条件を最適化したエラープロオン PCR により、変異体ライブラリーを作製した。FcRn の生産性を指標にスクリーニングすることで、生産性の向上した変異体を取得した。

取得した生産性向上変異体の遺伝子配列を解析し、生産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より生産性が向上した変異体を作製した。さらに生産性向上変異体をテンプレートに変異体ライブラリーを作製し、安定性向上株のスクリーニングを繰り返すことで、高い生産性を有する改良型 FcRn を複数創製した。

得られた改良型 FcRn は複数個のアミノ酸が置換され、天然型と比較して 40 倍以上の生産性向上が認められた (Fig. 1)。

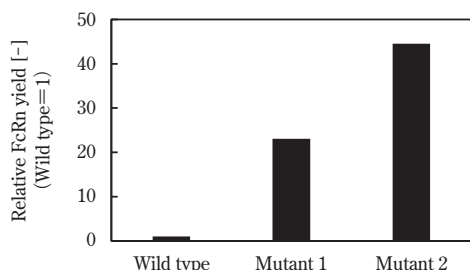


Fig. 1 Relative yield of FcRn mutants

[3] 発現系の最適化

創製した改良型 FcRn をコードするコドンヒト型から大腸菌型へ変更した。さらにタンパク質の翻訳開始に関わる 5'UTR 配列を改変し翻訳速度を調整した

ところ、翻訳開始速度 (Translation Initiation Rate) を遅くすることで結果的に FcRn 生産性が向上することを見出した (Fig. 2)。FcRn は分子内に 3 つのジスルフィド結合を形成し、特に α 鎖は溶解度が著しく低いため翻訳開始段階で翻訳速度を制限することで適切なフォールディングが促進されたと考えられる。

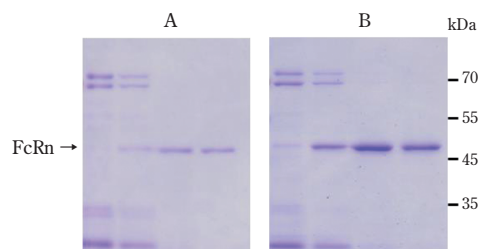


Fig. 2 Comparison of expression level (Translation Initiation Rate : A>B)

さらにタンパク質の分泌に関わるシグナルペプチドを各種検討した結果、大腸菌の外膜タンパク質 OmpA のシグナルペプチドを融合することで FcRn の生産性が向上することを見出した。

上述の検討に加え、FcRn 生産に適したプラスミドベクターや大腸菌株を適宜検討することで改良型 FcRn を発現させるプラスミドベクターおよび大腸菌株を決定した。

[4] FcRn の培養

作製した発現用プラスミドベクターにより得られた大腸菌の形質転換体を用いて培養条件の検討を実施した。窒素源組成の異なる種々の培地を用いて培養を行ったところ、培地組成により FcRn の発現量が大きく変化することを見出した (Fig. 3)。

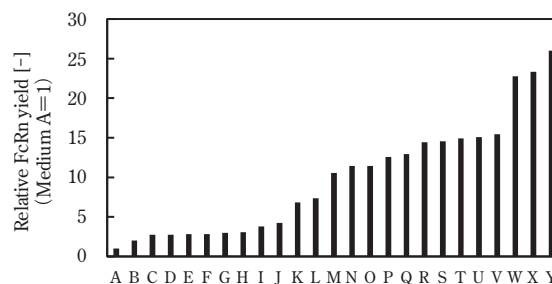


Fig. 3 Comparison of FcRn expression in *E. coli* cultured on different nitrogen sources

得られた結果をもとに形質転換体の高密度培養を実施した。この際、溶存酸素濃度を指標とし、培地添加

量を制御する流加培養法にて大腸菌を高密度に増殖させた後、IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を用いた発現誘導により FcRn 発現大腸菌を生産した。

培養終了後、高密度培養液を遠心分離することにより培養上清を除去し、FcRn 発現大腸菌を回収した。

[5] FcRn の抽出および精製

回収した FcRn 発現大腸菌を、界面活性剤や酵素等を用いて抽出した後、遠心分離およびフィルター過により清澄化した。抽出液の pH、電気伝導度を調整し、複数のクロマトグラフィーにより精製することで高純度な改良型 FcRn を取得した。

[6] FcRn カラムの作製

精製した改良型 FcRn をリガンドとして使用し、当社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た状態で当社独自のベース基材に固定化し、FcRn 固定化ゲルを取得した。FcRn 固定化ゲルを ϕ 4.6 mm \times 50 mm の分析用カラムに充填し、FcRn カラムを作製した (Fig. 4a、4b)。

[7] FcRn カラムの分離性能評価

FcRn カラムの分離性能評価として、Table 1 の条件にて抗体医薬品として市販されているリツキサンの分析を実施した。pH 5.5 ~ 6.5 の弱酸性緩衝液条件で平衡化した FcRn カラムにリツキサンを通液したところ

カラムへ吸着し、pH 7.4 ~ 8.5 の中性緩衝液にてグラジエント溶出することを確認した (Fig. 4c)。

これはエンドソームの弱酸性環境で IgG と結合し、細胞外の中性環境下で解離する生体内での FcRn の挙動と一致しており、FcRn カラムが天然型 FcRn の活性を保持していることを示している。

また、リツキサンの負荷量を変更し定量性の評価を行ったところ、2 μ g から 100 μ g までの広い範囲において高精度に定量できることを確認した (Fig. 4d)。

[8] FcRn カラムの使用耐久性能評価

作製した FcRn カラムの使用耐久性能評価を行った。上述の方法で抗体医薬品の吸脱着を繰り返し行ったところ 500 回使用後も素通り画分は見られず、FcRn が活性を維持していることを確認した (Fig. 4e)。

[9] 各種抗体医薬品の分析例

各種市販抗体医薬品の分析を実施した。ここでは一例としてリツキサン、アービタックス、ハーセプチン、エンブレル、ヒュミラの分析例を示す (Fig. 5)。エンブレルは TNFR II の細胞外領域と IgG の Fc 領域の融合タンパク質であり、その他は一般的な IgG 型の抗体医薬品である。上述の方法で各種抗体医薬品を評価したところ、抗体医薬品によって溶出時間に違いが見られた。これは抗体医薬品によって FcRn との親和性が異なることを表している。

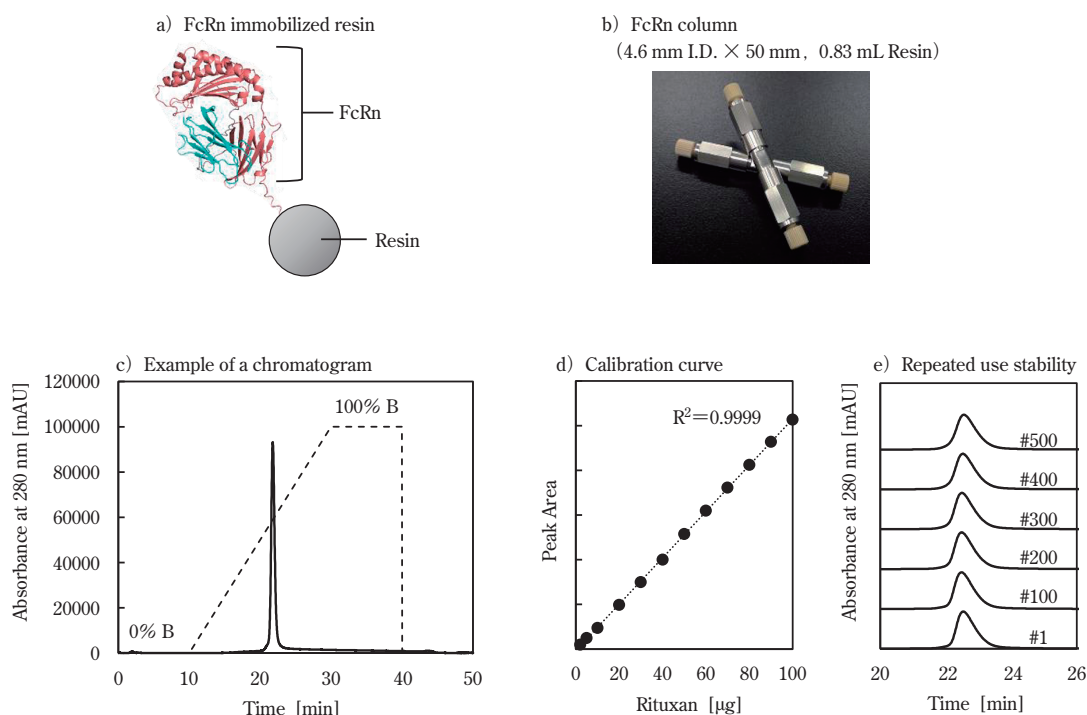


Fig. 4 Performance of FcRn column

Table 1 Equipment specifications

Name	FcRn column	
Resin	Base resin	Hydrophilic polymer
	Ligand	Modified human FcRn expressed in <i>E.coli</i>
Column	Size	4.6 mm I.D. × 50 mm (0.83 mL)
	Material	SUS
Conditions of use	Temperature	15-20°C
	Flow rate	0.4 mL/min
	Buffer A	50 mM MES, 150 mM NaCl, pH 6.5 ^{*)}
	Buffer B	50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5
	Gradient program	0-10 min A 100%, B 0% (Wash A) 10-30 min From B 0% to B 100% (Linear Gradient) 30-40 min B 100% (Wash B) 40-50 min A 100%, B 0% (Wash C)

^{*)}Conditions may vary depending on the sample being analyzed.

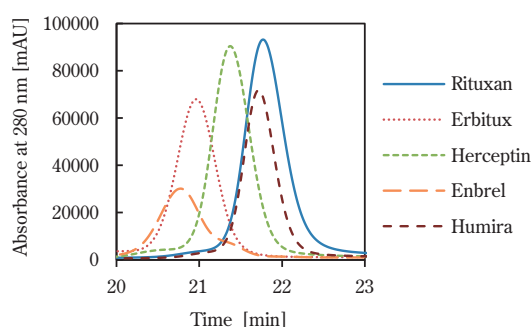


Fig. 5 Analysis of various antibody therapeutics

また、各種抗体医薬品の半減期を **Table 2** に示す。ここに挙げた抗体医薬品の半減期と、本 FcRn カラムの抗体溶出時間との間に相関が確認できる。IgG の長い半減期は FcRn との相互作用によりもたらされるものであり、これらの結果は本カラムを用いることで生体内における抗体医薬品の血中挙動を評価することが可能であることを示している。

つまり溶出時間が早い抗体医薬品は FcRn との親和性が低いため、生体内においてリソソームによる分解を受けやすく、逆に溶出時間が遅い抗体医薬品は分解を受けづらく長時間薬効を示す。すなわち FcRn との親和性にに基づいたデータをカラム溶出時間として得ることができる。

近年、血中動態を考慮した薬効の高い抗体医薬品の

Table 2 Half-lives of antibody therapeutics

Antibody therapeutics	Half-life [days] ⁶⁾
Enbrel	4.0
Erbitux	4.8
Herceptin	2.7-10
Rituxan	9.4
Humira	14.7-19.3

開発が進められており、IgG の Fc 領域のアミノ酸を置換することで FcRn との親和性を改変するような取り組みも行われている。ターゲットとする抗原によって適切な半減期は異なるため、本カラムを用いることで抗体溶出時間を指標に FcRn との親和性、つまり生体内挙動が *in vitro* で評価可能である。

[10] 酸化型抗体の分析例

抗体の不均一性の要因に Fc 領域のメチオニン残基の酸化が挙げられる。酸化型抗体は免疫原性の原因となるだけでなく、FcRn との親和性が低下することから血中動態が変化してしまうことが問題となっている^{8~10)}。

そこで酸化処理を行った抗体医薬品を、FcRn カラムを用いて分析した。ここでは一例としてリツキサンの分析例を示す。酸化処理はリツキサンに過酸化水素水を加え 4°C でインキュベートすることにより行った。酸化処理を施した抗体医薬品を、作製した FcRn カラムおよびサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 用カラムの TSKgel[®] G3000SW_{XL} を用いて分析した。その結果、SEC カラムではすべてのサンプルで同じ形状のクロマトグラムが得られた一方、FcRn カラムでは酸化処理に用いる過酸化水素水の濃度に応じてクロマトグラムに変化が見られ、酸化処理を行っていないリツキサンのピークと比較して溶出時間の早い 2 つの新たなピークを検出した (Fig. 6)。

また、分析に用いたリツキサンを LC-MS により解析したところ、溶出時間の早い 2 つのピークは Fc 領域のメチオニン一酸化体と二酸化体であることが判明し、本カラムを用いることで抗体の不均一性の要因である Fc 領域のメチオニン酸化価数を分析可能であることを示した。

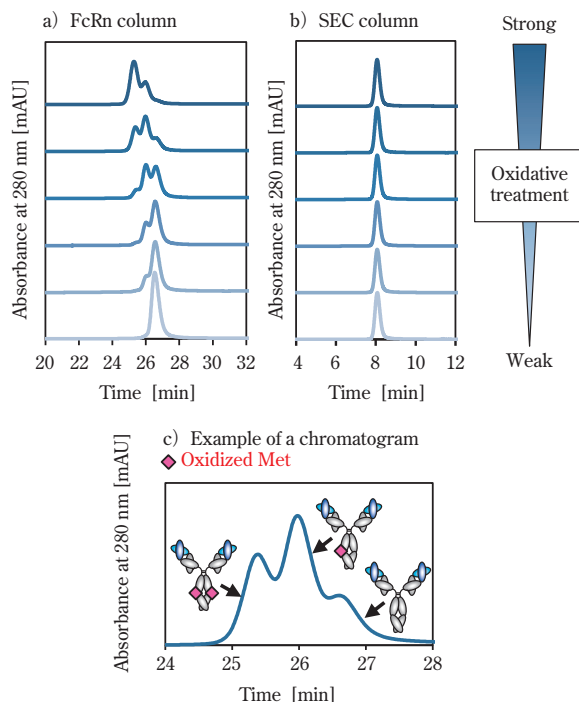


Fig. 6 Analysis of oxidized antibody therapeutics

4. まとめ

生体内での IgG リサイクリングに関与する受容体である FcRn を基材に固定化し充填したカラムを開発した。我々の開発した改良型 FcRn は生産性向上変異を複数個有することで、天然型に比べて大腸菌での生産性が 40 倍以上に向上した。また、発現系や培養精製などの生産プロセスを最適化することにより高収量、高収率での FcRn の生産を可能にした。

また、改良型 FcRn を使用した FcRn カラムは高い定量性および使用耐久性を有し、数百回以上の抗体吸脱着が可能である。さらに、グラジエント溶出を用いることで各種抗体医薬品を FcRn 親和性に基づいた溶出時間で分離することができる。本カラムは抗体医薬品だけでなく Fc 領域アミノ酸改変抗体や Fc 融合タンパク質についても分析可能であることから、血中動態を考慮した次世代型医薬品開発への適用が期待できる。

さらに本カラムは抗体の不均一性の要因である Fc 領域のメチオニン酸化価数の分離が可能であることから、抗体の品質管理への適用も可能である。

以上のように今回開発した FcRn 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等、様々な場面での適応が可能であり、今後の抗体開発に様々な方向から寄与することが期待できる。

5. 参考文献

- 1) TPC Marketing Research、2024 年 世界の抗体医薬品市場 (2024)
- 2) Brambell FW, *et al.*, *Nature*, **203**, 1352-1354 (1964)
- 3) Roopenian DC, *et al.*, *J. Immunol.*, **170**(7), 3528-3533 (2003)
- 4) Junghans RP, *Immunol. Res.*, **16**(1), 29-57 (1997)
- 5) Simister NE, *et al.*, *Nature*, **337**(6273), 184-187 (1989)
- 6) 石井明子、鈴木琢雄、多田稔、川西徹、山口照英、川崎ナナ、*日本薬理学雑誌*、**136**(5)、280-284 (2010)
- 7) Roopenian DC, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, **7**(9), 715-725 (2007)
- 8) Shacter E, *Drug Metab. Rev.*, **32**(3-4), 307-326 (2000)
- 9) Bertolotti-Ciarlet A, *et al.*, *Mol. Immunol.*, **46**(8-9), 1878-1882 (2009)
- 10) Gao X, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **104**(2), 368-377 (2015)
- 11) 長門石曉、Jose M. M. Caaveiro、津本浩平、*薬学雑誌*、**138**(8)、1033-1041 (2018)
- 12) Fang Y, *et al.*, *Mol. Biosyst.*, **9**, 806-811 (2013)
- 13) Feng Y, *et al.*, *Protein Expr. Purif.*, **79**(1), 66-71 (2011)