

Fcレセプター固定化分離剤を用いた抗体糖鎖構造に基づく分離

寺 尾 陽 介*¹
 山 中 直 紀*¹
 朝 岡 義 晴*²
 遠 藤 諭*²
 田 中 亨*³
 大 江 正 剛*²
 井 出 輝 彦*⁴

Separation of Antibody by Fc Receptor Resin Based on Antibody's Glycan Structures

Yosuke TERAO
 Naoki YAMANAKA
 Yoshiharu ASAOKA
 Satoshi ENDO
 Toru TANAKA
 Seigo OE
 Teruhiko IDE

We have developed a new and unique affinity resin coupling Fc gamma receptor IIIa (FcR) that efficiently separates antibodies based on their glycan structure. Fc gamma receptor IIIa is known as one of key molecules in the human immune system and is expressed on the surface of our immunocytes. The binding affinity between antibodies and FcR affects the efficacy of the therapeutic antibody drugs, especially the ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) activity.

ADCC activity is one of the important efficacies of antibody drugs and is reported to be enhanced by the specific amino acid mutations of the antibody drugs, or the specific glycan structure changes of antibody drugs, e.g. lack of the core fucose.

We found that our FcR resin can clearly separate the antibodies with core fucose and those without core fucose on their glycan structure. Two CHO cell lines producing the fucosylated or non-fucosylated antibody were established by our laboratory. The evaluation of ADCC activity of the fractions containing the fucosylated or non-fucosylated antibody separated by our FcR resin revealed that the ADCC activity of the fraction containing the non-fucosylated antibody was 100 fold higher than that of the fucosylated antibody. The glycan structure analysis of the separated fractions in the FcR chromatography elucidated that the antibody without core fucose showed longer elution time, that means high affinity with FcR, while on the other hand, the fraction with core fucose showed shorter elution time, that means low affinity with FcR.

These results provide new insight into our FcR resin. It could be a powerful tool for the analysis of the glycan structure of antibodies or for monitoring and controlling the glycan structure during antibody manufacturing.

* 1 ライフサイエンス研究所 バイオプロセスグループ
 * 2 ライフサイエンス研究所 生物機能工学グループ

* 3 バイオサイエンス事業部第二開発部セパレーショングループ
 * 4 ライフサイエンス研究所

1. 緒 言

近年、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。また、その市場は、年率8%もの高成長率にて全世界で9兆円（2020年）にも達すると予想されている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、低投与量でも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等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大きくその結合に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（Fc Receptor）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薬効（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出され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⁾。

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細胞等）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、様々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、ろ過等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複雑な糖鎖構造を有しており、糖鎖構造の型によりその薬効（特にADCC活性）にも影響が出てくることから⁷⁾、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（特に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。

我々は、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用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⁸⁾。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。

本報告では、抗体の糖鎖構造を識別する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に関する開発結果を報告する。

2. 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等で公表されている⁹⁾。

[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ーンPCR法¹⁰⁾により行った。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

遺伝子組み換え大腸菌を当社独自の組成の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。大腸菌を回収後、界面活性剤や酵素による抽出の後、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¹¹⁾。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5μm）に固定化用官能基を導入し、FcRを固定化した。作製したFcR固定化分離剤を分析用カラムへと充填し、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薬効 (ADCC 活性) を ADCC アッセイキット (プロメガ社) により測定した。

[7] コアフコースフリー型リツキシマブ生産株の作製

市販発現ベクターにリツキシマブ (DrugBank¹²⁾: DB00073) のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列を挿入し、リツキシマブ発現ベクターを作製、生産用 CHO 細胞に遺伝子導入した。CHO 細胞として浮遊細胞である DG44 株を使用した。発現ベクターに導入した選択マーカーで選択後、dhfr / MTX 遺伝子増幅により、リツキシマブ安定生産株を作製した。さらに作製した生産株から単クローニング操作により、リツキシマブ高生産株を取得した。

コアフコース欠損株作製のため、市販遺伝子ノックアウト用ベクターに、フコース転移酵素 (FUT8) をターゲットとした配列を挿入し、フコース欠損株作製用ベクターを作製した¹³⁾。続いて、リツキシマブ生産 CHO 細胞株に、フコース欠損株作製用ベクターを遺伝子導入し、薬剤選択マーカーおよびフコースを認識するレクチン (LCA) を用いてフコース欠損株を取得した。同様の単クローニングにより、フコースフリー型リツキシマブ高生産株を作製した。

[8] リツキシマブの生産

コアフコースフリー型リツキシマブ生産 CHO 細胞を培養し、培養液からプロテイン A カラムによるアフィニティー精製によりコアフコースフリー型リツキシマブを作製した。また、フコースを欠損していないフコース結合型リツキシマブを生産し、同様にアフィニティー精製により取得した。

3. 結果と考察

[1] FcR 発現系の構築

ヒト Fcγ R IIIa 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を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、安定性向上株をスクリーニングすることを繰り返すことで、高生産性、高耐酸性を有する安定化 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保持していた (Fig. 1)。

[3] 安定化 FcR の生産

安定化 FcR 生産用大腸菌の培養を高密度培養にて実施した。当社独自の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にて、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

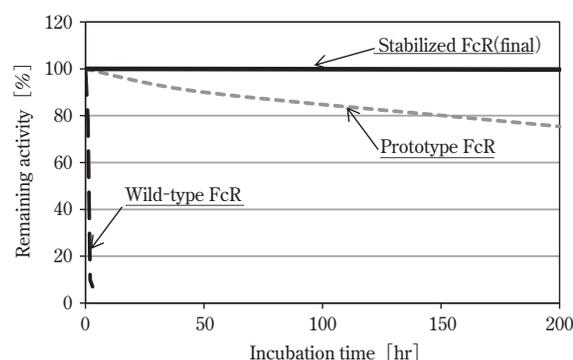


Fig. 1 Evaluation of stability of improved FcR under acidic condition

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。界面活性剤や酵素等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にて精製することで、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 (Fig. 2)。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 (Table 1)。

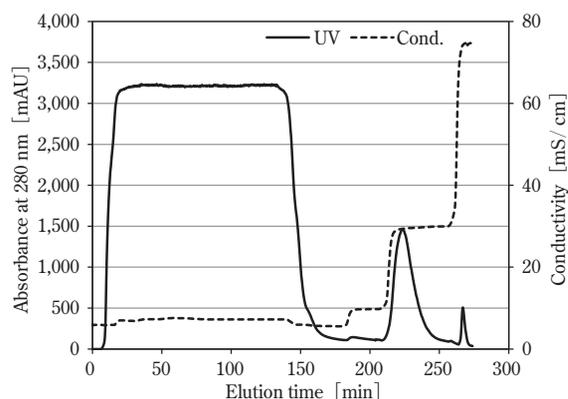


Fig. 2 Chromatogram of FcR purification with TOYOPEARL CM-650M

[4] FcR 固定化ゲルの分離性能評価

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 固定化ゲルを ϕ 4.6 mm \times 75 mm の分析用カラムに充填し、FcR カラムを作製した。FcR カラムの分離性能評価として、Table 2 の条件 (分析条件の一例) に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 (Fig. 3) 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 Fig. 4 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、ゲル表面上で抗体を保持する結合力が異なることから、Fig. 4 のような分離パターンが得られると考えられる。

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。Fig. 5 に示したように、培養液成分は FcR カラムには吸着

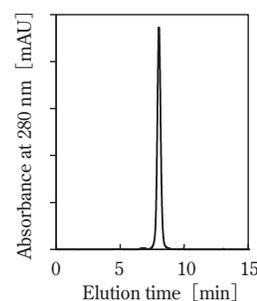


Fig. 3 Chromatogram of Rituxan using SEC column

Table 1 Analysis of purified FcR*

Analysis items	Standard value	Results	
		Lot A	Lot B
SEC	$\geq 95\%$	98%	99%
RP-HPLC	$\geq 95\%$	99%	99%
SDS-PAGE	Single band	single	single
Spectrum ratio of 280/250	≥ 1.2	2.5	2.6
Protein Concentration	2 ± 0.1 g/L	2.0	2.0
Endotoxin Concentration	≤ 20 EU/mg	0.5	2.1
Conductivity	60-90 mS/cm	72	86

*FcR : MW=21 kDa, pI=6.4, Tm=57.1°C
stable under acidic condition (pH 3.0, ≥ 100 hr)

Table 2 Analysis condition

Equipment	HPLC system
Column	FcR column (4.6 mmI.D.×75 mm)
Buffer A	20 mM sodium acetate + 50 mM NaCl pH 5.0
Buffer B	10 mM glycine-HCl pH 3.0
Gradient	0-2 min 0%B 2-30 min 0%B to 100%B linear 30-40 min 100%B 40-50 min 0%B (re-equilibration)
Temperature	25 °C
Flow Rate	0.6 mL/ min
Sample	antibody 5 µg
Detection	UV absorbance at 280 nm

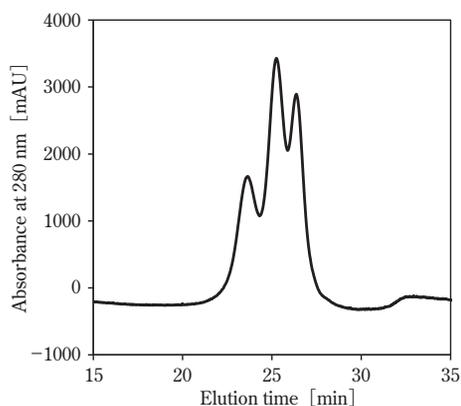


Fig. 4 Chromatographic profile of Rituxan using FcR column

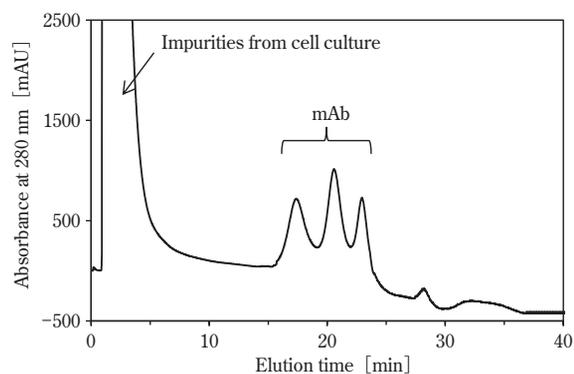


Fig. 5 Direct analysis of mAb from cell culture

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、Fig. 6 のよ

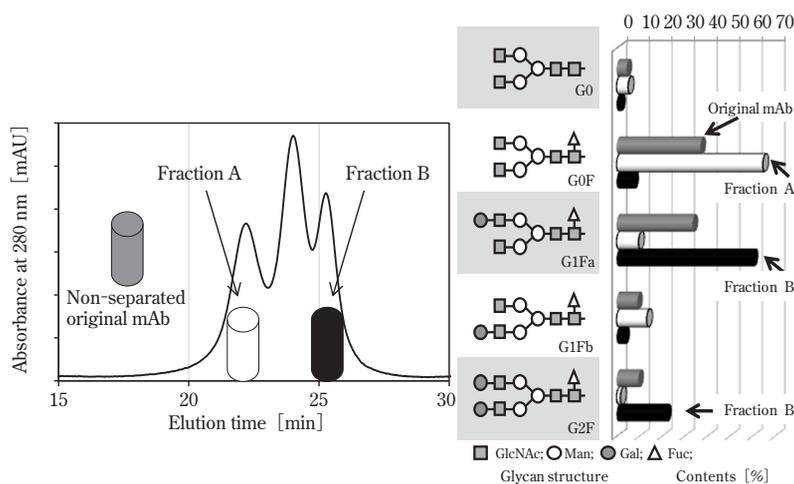


Fig. 6 Glycan structure analysis of the mAb's fraction separated by FcR column

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無いものが多く、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等の特徴が見い出された。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 Fig. 7 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 Fig. 6 より推察できるが、一方で、その他の糖鎖構造の影響につ

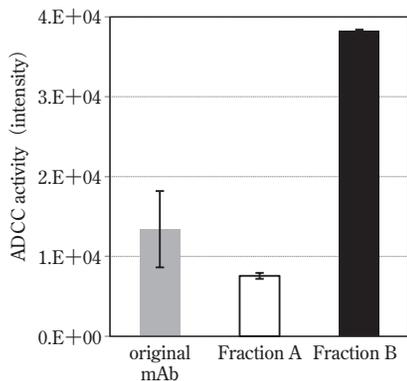


Fig. 7 ADCC activity analysis of the mAb's fraction separated by FcR column

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 Fig. 8 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。これは各抗体に結合している糖鎖構造がそれぞれ異なっているためであると考えることが出来る。すなわち、FcR カラムが示す分離パターンは、糖鎖構造の違いが、各抗体医薬品の薬効 (ADCC 活性) の指標となっていることを表している。例えば、抗ガン剤であれば、より強い細胞を殺傷する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 と強い結合力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、Fig. 9 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。

[8] コアフコースフリー型リツキシマブ生産株の作製

市販 pIRES ベクターに遺伝子増幅のための dhfr 遺伝子を挿入、IRES 領域を除去、プロモーター領域を

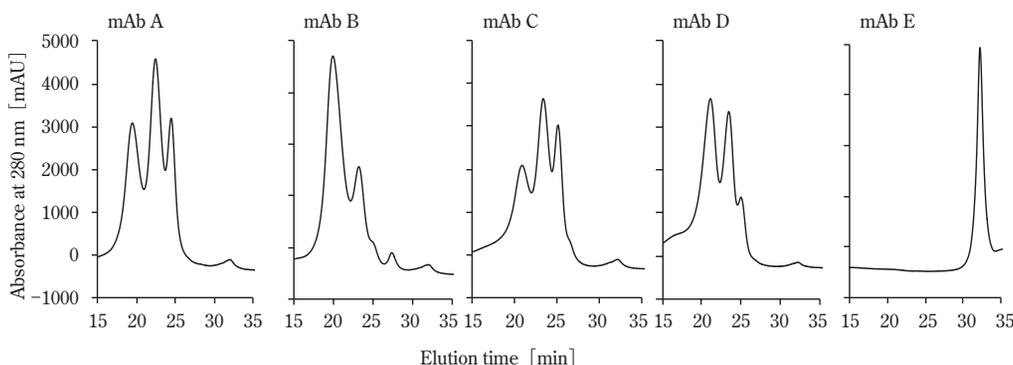


Fig. 8 Chromatographic profiles of several mAbs separated by FcR column

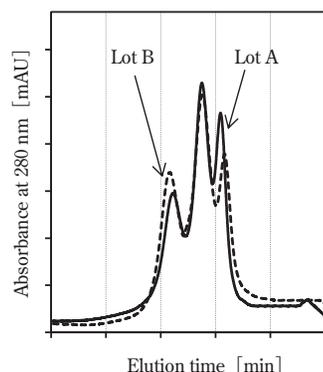


Fig. 9 Chromatographic profiles of mAbs with different production lot

CAG プロモーターへと変更、および新たに CAG プロモーターを挿入した抗体発現ベクター pCAG_dhfr を構築した。リツキシマブの重鎖、軽鎖のそれぞれのアミノ酸配列をコードする遺伝子を挿入することで抗体発現ベクターを作製した。作製した抗体発現ベクターを CHO 細胞 (DG44 株) へ遺伝子導入し、リツキシマブ産生細胞株を作製した。数段階のメトトレキサート (MTX) による遺伝子増幅の後、限外希釈法を用いた単クローニング操作により、安定的にリツキシマブを発現するリツキシマブ高生産株 (リツキシマブ生産量: 数 10 mg/L) を取得した。

CRISPR-Cas9 遺伝子ノックアウト用ベクターに、フコース転移酵素 (FUT8) をターゲットとしたガイド RNA 配列を挿入し、コアフコース欠損株作製用ベクター pDel_FUT8 を作製した。続いて、リツキシマブ高生産 CHO 細胞株に、コアフコース欠損株作製用ベクター pDel_FUT8 を遺伝子導入し、ネオマイシンによる薬剤選択およびコアフコースを認識するレクチン (LCA) を用いたスクリーニングによりフコース欠損株を取得した。さらに限外希釈法による単クローニングにより、コアフコースフリー型リツキシマブ高生産株を作製した。得られた生産株のゲノム DNA を回収し、FUT8 遺伝子配列の解析を実施したところ、数塩基の欠失が認められ、FUT8 遺伝子が欠損していることが確認された。

[9] リツキシマブの生産

コアフコースフリー型リツキシマブ高生産株を市販 CD OptiCHO 培地を使用して 37°C、8% CO₂ 存在下、振とう培養を実施し、抗体含有培養液を取得した。培養上清から TOYOPEARL® AF-rProtein A HC-650F ゲルを用いたアフィニティー精製によりコアフコースフリー型リツキシマブを調製した。また、フコースを欠損していないフコース結合型リツキシマブを同様に生

産、精製し、取得した。

[10] フコースフリー型およびフコース結合型リツキシマブの FcR カラムによる分離

作製した各リツキシマブの FcR カラム分離を実施し、Fig. 10 のようなクロマトグラムを得た。抗体の糖鎖構造のうち、コアフコースは FcR との結合に大きく寄与することが知られていることから、FcR カラムを用いた分離においても、フコースフリー型リツキシマブは FcR と強く結合し、溶出時間が遅い画分に溶出された。一方、通常のフコース結合型リツキシマブは FcR と強く結合せず、溶出時間もより早いものであることが判明した。

[11] 分離フラクションの分析

分離フラクションに含まれる抗体の糖鎖構造の解析、および ADCC 活性を測定した。糖鎖構造解析 (Fig. 11) では、コアフコースを欠損させたフコースフリー型リツキシマブが、コアフコースの無い糖鎖構造であることを確認し、さらに溶出時間の早いものは末端のガラクトースが無いもの、溶出時間の遅いものはガラクトースを含んでいるものであることを確認することが出来た。一方、通常のフコース結合リツキシマブでも同様の傾向が確認された。

また、ADCC 活性測定では、フコースフリー型リツキシマブはフコース結合型と比較して、Fig. 12 に示したように約 100 倍薄い濃度でも同等の細胞殺傷能力 (ADCC 活性) を有していることが確認できた。すなわち、フコースフリー型リツキシマブはフコース結合型リツキシマブよりも約 100 倍強い ADCC 活性を有しており、抗体の糖鎖構造のフコースの有無で ADCC 活性が大きく異なることが確認できた^{5, 14)}。

以上の結果より、フコースフリー型の糖鎖構造を持

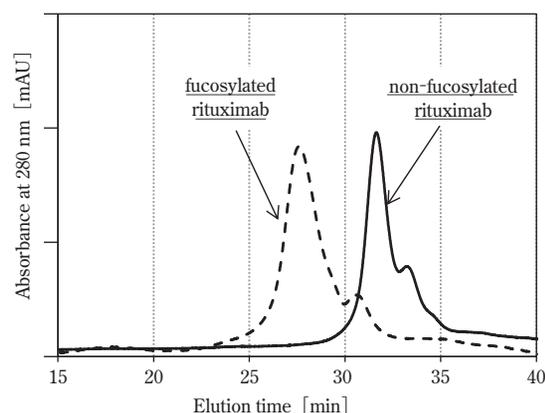


Fig. 10 Chromatographic profiles of fucosylated or non-fucosylated rituximab

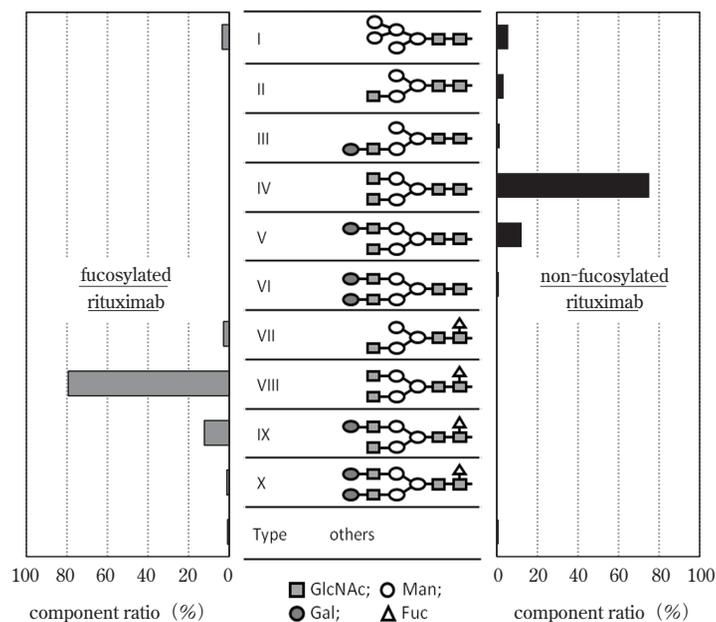


Fig.11 Glycan structure analysis of the fucosylated or non-fucosylated rituximab

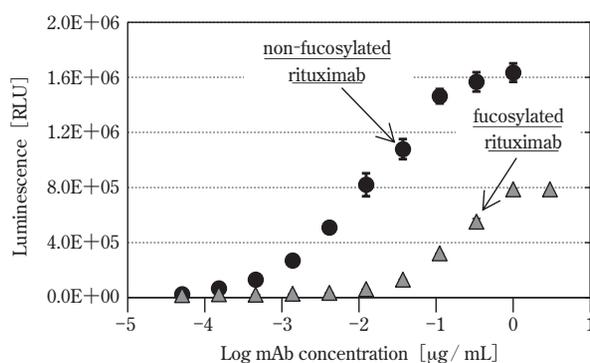


Fig.12 Evaluation of ADCC activity of the fucosylated or non-fucosylated rituximab

つ抗体は、FcR カラムと強く結合し、溶出時間が遅くなること、および抗体の薬効 ADCC 活性が強いことが確認された。また、抗体と FcR との結合に糖鎖構造中のフコースが大きく寄与しており、開発品の FcR カラムが抗体との親和性に基づいて分離できること、およびその結果として抗体の薬効 ADCC 活性の強さを判定できることが確認された。

4. まとめ

以上のように、ヒトの免疫機構の一翼を担う Fc レセプター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薬効である 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薬効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等、様々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。

本研究開発の一部は、経済産業省の「平成 25 年度産業技術実用化開発事業費補助金（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 年度産業技術実用化開発事業費補助金（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」の支援によって行われた。

5. 参考文献

- 1) JP モルガン・アセット・マネジメント(株)マーケットレポート (2017 年 1 月)
- 2) 石井明子、津本浩平、YAKUGAKU ZASSHI, 137, 815 - 816 (2017)
- 3) M. Satoh, et al., *TIGG*, 18, 129-136 (2006)
- 4) R. L. Shields, et al., *J. Biol. Chem.*, 277, 26733 - 26740 (2002)
- 5) T. Shinkawa, et al., *J. Biol. Chem.*, 278, 3466-3473 (2003)
- 6 a) 設楽研也、YAKUGAKU ZASSHI, 129, 3-9 (2009)
- 6 b) T. Ishii, et al., *Clin. Cancer Res.*, 129, 1520-1531 (2010)
- 7 a) R. A. Clynes, et al., *Nat. Med.*, 6, 443-446 (2000)
- 7 b) P. Carter, *Nat. Rev. Cancer*, 1, 118-129 (2001)
- 8) 寺尾 陽介、今泉 暢、山中 直紀、半澤 敏、東ソー研究・技術報告、58、35-38 (2014)
- 9) Uniprot URL : <http://www.uniprot.org/>
(Fcγ Receptor IIIa の番号 : P08637)
- 10) D. W. Leung, et al., *Techniques*, 1, 11-15 (1989)
- 11) 特開 2016-183113
- 12) DrugBank URL : <https://www.drugbank.ca/>
(リツキシマブの番号 : DB00073)
- 13 a) L. Cong, et al., *Science*, 339, 819-823 (2013)
- 13 b) P. Mali, et al., *Science*, 339, 823-826 (2013)
- 14 a) Y. Terao, et al., PREP2016 Symposium Poster #P-T-213
- 14 b) Y. Terao, et al., PREP2017 Symposium Poster #P-T-234

