

● TSKgel FcR-IIIa-NPR を用いた血中 IgG 分離 パターン測定による疾患検査法の開発

研究企画部 オープンイノベーション推進グループ 秋山 泰之
バイオサイエンス事業部 第一開発部 技術グループ 森本 篤史

1. はじめに

液性免疫の重要な要素の一つである抗体（図1）は、中和活性、補体依存性細胞傷害活性（CDC 活性）、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC 活性）などの免疫活性に深く関与している¹⁾。特に、抗体のFc領域に付与する糖鎖構造によって、抗体の活性が大きく影響を受けることがわかっており²⁾、広く利用されている抗体医薬品の薬効にも影響を与えることから、品質管理におけるリスク因子として注目されている。ヒト体内で産生される抗体に結合している糖鎖構造においても、性別³⁾、年齢^{3, 4)}、妊娠⁵⁾、自己免疫疾患⁶⁾、癌⁶⁾など疾患を含めた身体的変化との関連性が報告されている。これまでの報告では、主に抗体に結合した糖鎖構造を質量分析計により測定しており、測定に係る作業の煩雑さ、前処理から解析結果を得るまでの時間の長さから、糖鎖構造に着目した臨床研究は多くなく、また体内における糖鎖構造変化のメカニズムは未だ明らかにされていない。

そこで当社では、抗体の活性に関わるFcレセプター（FcR）の中でも、ADCC活性に深く関与しているFc γ RIIIaを担体表面に固定化した、アフィニティ分析カラムTSKgel FcR-IIIa-NPRを用いたヒト血中抗体の測定法を構築した。本カラムは抗体医薬品の品質管理や品質向上に向けて商品化した製品であるが、ヒト血中抗体においても適用可能であることを実証した。

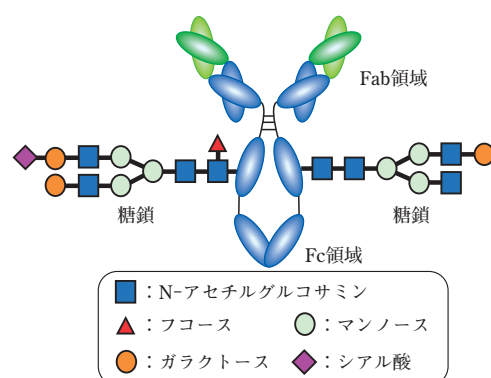


図1 抗体の構造

本手法により、血中抗体の糖鎖構造に基づくADCC活性の違いを迅速、簡便に明らかにすることが可能となる。本稿では、本カラムを用いた血中抗体測定における基本的性能と、臨床検体を用いた応用例について述べる。

なお、本技術はヒト体内で産生される抗体活性の臨床的有用性およびメカニズム解明に資するものであり、SDGsが定める国際目標の内、「すべての人に健康と福祉を」への貢献が期待できる。

2. 基本原理

抗体による免疫活性の一つであるADCC活性は、抗体分子がターゲット細胞上の抗原に結合するだけでなく、細胞傷害活性を有するエフェクター細胞との結合に依存して、活性が変わると考えられている。その結合は、エフェクター細胞上のFcRと抗体のFc領域との結合であり、特にナチュラルキラー細胞（NK細胞）上のFc γ RIIIaとの結合が重要とされている⁷⁾。Fc γ RIIIaと抗体のFc領域との結合が強いほど、ADCC活性が強くなることが知られており、その結合能にFc領域に結合した糖鎖構造が影響を与えていることが報告されている^{8, 9)}。例えば、糖鎖構造としてフコースが結合しているとADCC活性が低下し、ガラクトースが結合するとADCC活性が向上することが明らかとなっている²⁾。

本稿で用いているTSKgel FcR-IIIa-NPRは、Fc γ RIIIaとの親和性の違いに基づいて抗体を分離することができるカラムであり、抗体のADCC活性に基づいた分析を可能とする¹⁰⁾。本カラムは、非多孔質性の親水性ポリマー基材に、遺伝子組換えヒトFc γ RIIIaの細胞外領域をリガンドとして導入した担体を充填したHPLC用カラムである。中性条件で多くの抗体がFc γ RIIIaリガンドに吸着し、酸性条件にすることで溶出するため、2液グラジェントが可能なHPLCシステムを用いることで、迅速、簡便に測定することが可能である¹¹⁾。

3. 基本的性能

[1] 標準的分離条件

本稿で用いたカラムは、4.6mmI.D. × 7.5cm の PEEK 製カラムである TSKgel FcR-III A-NPR に充填した担体を、4.6mmI.D. × 5cm のステンレス製カラムに再充填することで得たカラムを用いている。分離能は低下するものの、分析時間を従来の 3 分の 2 である約 20 分で測定が可能である迅速性を優先して、本カラムを用いた。

溶離液は、サンプル導入時の吸着用溶離液（溶離液 A）として 100mM NaCl を含む 10mM クエン酸緩衝液（pH6.5）、溶出用溶離液（溶離液 B）として 500mM NaCl を含む 10mM クエン酸緩衝液（pH4.5）を用いた。

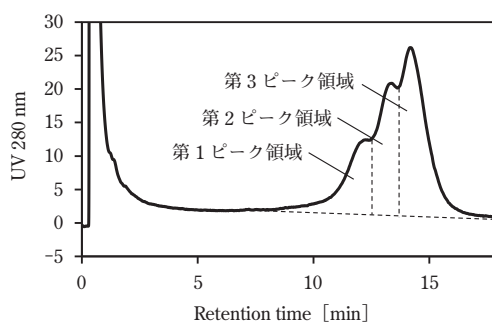
測定に用いた血液サンプルは、血液を遠心することで得た血清を溶離液 A で 20 倍に希釈した後、0.45 μ m のフィルターで処理したサンプルを用いている。血液サンプルの導入量は 10 μ l としている。

血液サンプル導入後、不純物が素通りするまで溶離液 A で平衡化し、その後溶離液 B をグラジエントで流すことによって血中抗体の分離パターンを得た（図 2）。溶離液 B でのグラジエントを開始してから得られるピークを溶出時間の早い順に第 1、第 2、第 3 ピークと定義し、全ピーク面積で各ピーク面積の値を割った値をピーク面積%とした。また異なる検体の血液サンプルを測定すると、検体毎に抗体分離パターンの形状が異なることが確認された（図 3）。この結果から、ヒト血中抗体の分離パターンを取得することが可能であり、さらに血中抗体の本カラムとの結合能の個人差を評価可能であることが確認できた。

[2] 溶出時間の補正と測定再現性

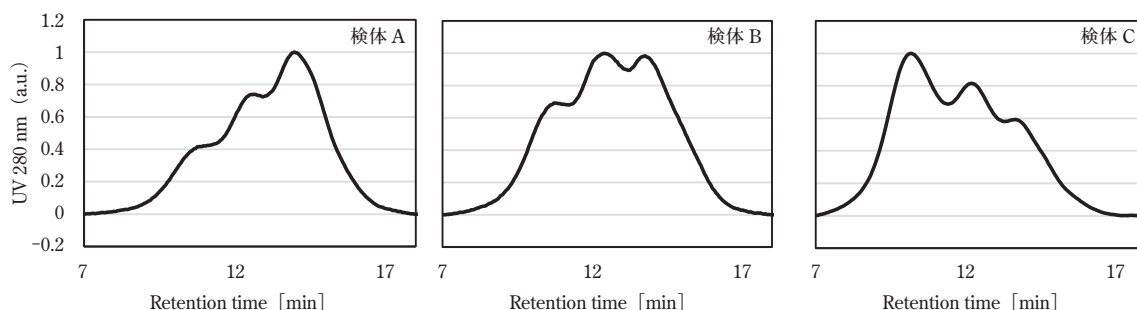
HPLC における測定値は、溶離液組成の変動、カラムのロット、カラムへの夾雑物の付着等、様々な要因で変動する可能性がある。日内差、日間差を抑えるため、補正のための標品を血液サンプル測定毎に測定することで、血中抗体の分離パターンを補正した。

補正で用いる標品としては、市販の抗体医薬品 X を用い、標品測定で得られる 3 つのピーク時間と基準となる各ピーク時間との差異（図 4）から得られる単回帰式を基に、標品測定直後に測定した血液サンプルの溶出時間を補正することで、測定間差を補正した（図 5）。基準となる各ピーク時間は、特定時点の標品の測定結果の値を用いればよく、本評価では、カラム使用開始日に測定した標品の結果を基に求めた。クオリティーコントロールとして、同一検体の血液サンプルを各測定日の開始直後、終了直前、中間時点の 3 点



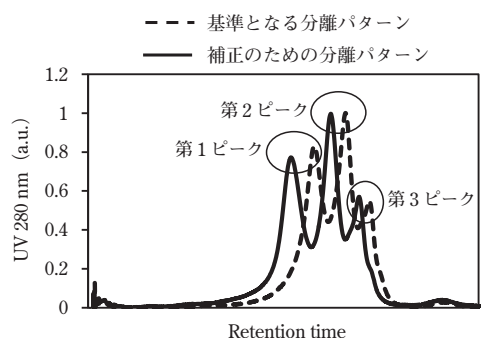
グラジエント：B0% (0-7 min), B0→100% (7-18 min)
 流速：1.2 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25℃
 試料：血液サンプル

図 2 血中抗体分離パターン



グラジエント：B0% (0-7 min), B0→100% (7-18 min)
 流速：1.2 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25℃
 試料：血液サンプル
 分離パターン処理：グラジエント開始時間(7 min)、終了時間(18 min)に対してベースラインを取り、その間の最大ピーク値を 1 として正規化

図 3 各検体における血中抗体分離パターン



グラジエント：B0% (0-7 min), B0→100% (7-18 min)
 流速：1.2 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25℃
 試料：抗体医薬品 X
 分離パターン処理：グラジエント開始時間 (7 min)、終了時間 (18 min) に対してベースラインを取り、その間の最大ピーク値を 1 として正規化

図4 標品による分離パターンの変動評価

で測定することで、血中抗体分離パターンの各ピーク面積%の変動度を評価した (図6)。各ピーク面積%の平均値±10%以内にどの測定値も収まっており、日間変動度も CV 値 10%以下であることから、安定した測定が可能であることが確認できた。

[3] 血中抗体の安定性

血中抗体の保存における分離パターン変化を評価した。採血から血清に分離するまでの時間、および血清分離後の保存期間においても変動は見られないことから、血中抗体の安定性の高さを確認した (図7)。

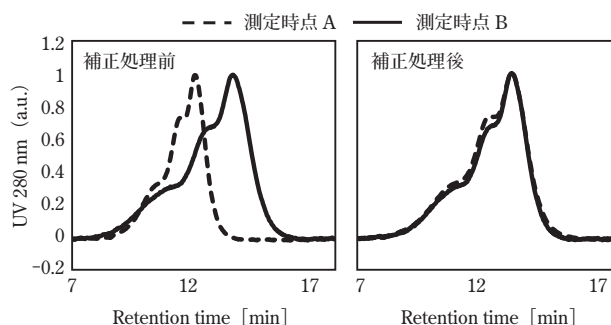
[4] 抗体糖鎖構造と抗体分離パターンとの相関

血中抗体分離パターンから得られるピーク面積%と、抗体結合糖鎖比率との相関を評価した (図8)。抗体結合糖鎖は質量分析計を用いて抗体から切り出した糖鎖を測定した。その結果、ガラクトースが結合した糖鎖の割合と、第3ピーク面積%とが有意に正の相関を示すことがわかり、糖鎖の違いを抗体分離パターンが反映していることを確認した。

4. 応用例

[1] 肺がん患者の血中抗体評価

和歌山県立医科大学で収集した非小細胞肺癌患者 (NSCLC) の血清 96 例、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の血清 42 例、東北メディカル・メガバンク機構より



グラジエント：B0% (0-7 min), B0→100% (7-18 min)
 流速：1.2 mL/min
 検出：UV 280 nm
 温度：25℃
 試料：血液サンプル
 分離パターン処理：グラジエント開始時間 (7 min)、終了時間 (18 min) に対してベースラインを取り、その間の最大ピーク値を 1 として正規化

図5 血中抗体分離パターンへの溶出時間補正

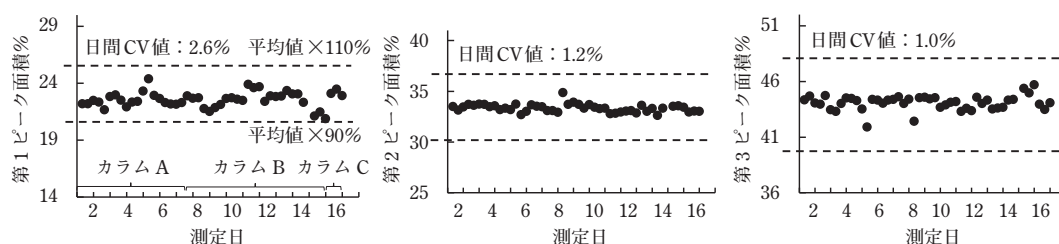


図6 クオリティーコントロールによる各ピーク面積%の変動評価

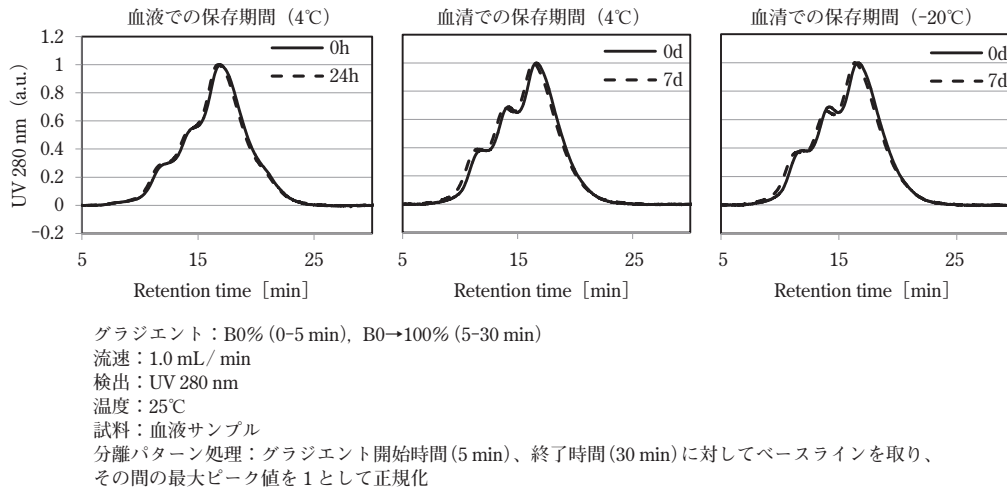


図7 各保存条件における血中抗体分離パターンの変動評価

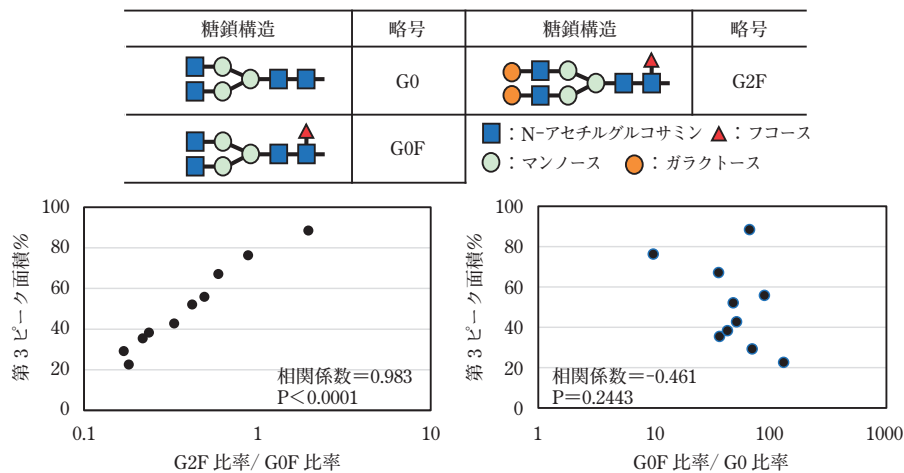


図8 血中抗体分離パターンと抗体結合糖鎖との相関評価

分譲を受けた健康者の血清 50 例について (表 1)、血中抗体分離パターンを測定した。

その結果、健康者検体および COPD 検体では、第 3 ピーク面積% (ADCC 活性の高い IgG の割合) に違いは見られなかったが、NSCLC 患者では第 3 ピーク面積%が有意に低下した (図 9)。喫煙歴等の臨床背景の似ている COPD、NSCLC 患者間においても有意差があることから、肺疾患の中でもがん疾患特異的に値が変動したと考えられる。

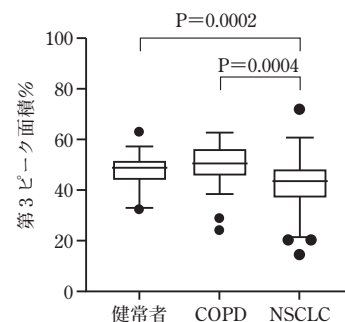


図9 各検体における血中抗体分離パターンの測定値

[2] 肺がん患者の生存予後予測評価

免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 投与後の NSCLC 患者の無増悪生存期間および全生存期間を、全患者の ICI 投与前の血中抗体分離パターンの第 3 ピーク面積%の中央値を閾値として高値、低値の 2 群に分けた患者集団で評価した (図 10)。

その結果、無増悪生存期間に有意差は見られなかったが、全生存期間において投与前の第 3 ピーク面積%の値が低い群で有意に生存予後が悪いことが明らかとなった (図 10 A, C)。ICI 投与前に化学療法を受けていた検体のみで評価した結果、全生存期間の P 値はよ

表1 評価に用いた各検体情報

検体数	健常者 (N=50)	COPD (N=42)	NSCLC (N=96)
年齢 [中央値 (幅)]	69.5 (60-74)	75 (53-90)	70 (49-91)
性別 [n (%)]			
男性	10 (20.0)	37 (88.1)	75 (78.1)
喫煙歴 [n (%)]			
現在もしくは元喫煙者	0 (0)	42 (100)	76 (79.2)
Pack year [中央値 (幅)]	0 (0)	55.75 (14.5-132)	40.7 (0-147)

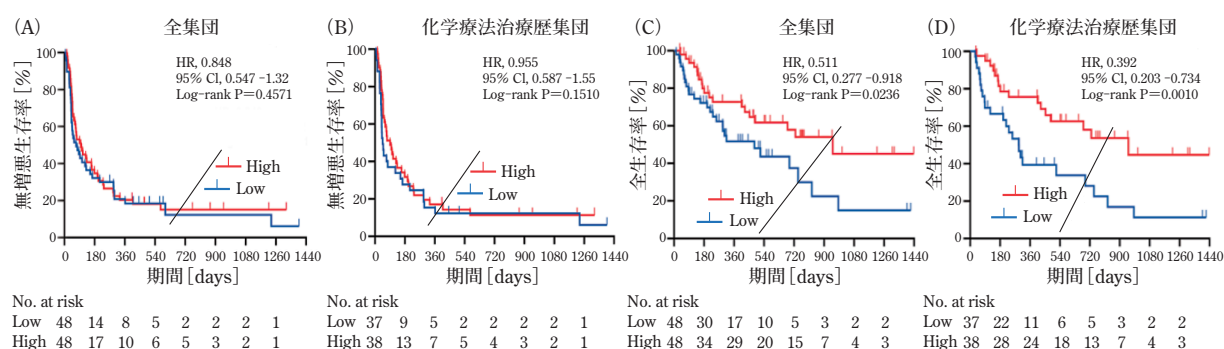


図10 ICI投与後の無増悪生存期間 (A, B)、全生存期間 (C, D)

り低い値となった (図10 B, D)。この結果は、血中抗体分離パターンががん患者の予後バイオマーカーとしての可能性を秘めていることを示している。

5. おわりに

本稿では、アフィニティ分析カラム TSKgel FcR-III A-NPR を用いたヒト血中抗体測定における基本的性能と、臨床検体を用いた応用例について報告した。従来、抗体の糖鎖構造解析や活性解析には煩雑な作業や、解析結果を得るまでの長い時間が必要であったが、本カラムを用いた新規分析法では簡易な前処理を行った後、HPLC で測定するのみであることから、簡便、迅速に安定した結果を得ることができる。また血中抗体分離パターンの相違や変動を基に、疾患の発生、進行評価にも応用できる可能性があることから、今後ヒト体内で産生された抗体活性を測定することの臨床有用性および抗体糖鎖構造の変動メカニズム解明の一助になることを期待したい。

6. 謝辞

本臨床評価における多大なるご協力、ならびに多くのご助言を頂きました和歌山県立医科大学内科学第三講座・洪 泰浩病院教授、同大学バイオメディカルサイエンスセンター・小柳 潤助教に厚く御礼申し上げます。

ます。また、本臨床評価で用いた健常者検体の分譲を行って頂きました東北大学 東北メディカル・メガバンク機構および岩手医科大学 いわて東北メディカル・メガバンク機構に厚く御礼申し上げます。

7. 引用文献

- 1) C. Peters., et al., *Biosci. Rep.*, **35**, e00225 (2015)
- 2) A. C. Chan, et al., *Nat. Rev. Immunol.*, **10**(5), 301-316 (2010)
- 3) X. Yu, et al., *Medicine*, **95**(28), e4112 (2016)
- 4) M. Pucić, et al., *Mol. Cell. Proteomics*, **10**(10), M111.010090 (2011)
- 5) F. E. van de Geijn, et al., *Arthritis Res. Ther.*, **11**, R193 (2009)
- 6) I. Gudelj, et al., *Cell. Immunol.*, **333**, 65-79 (2018)
- 7) R. A. Clynes, et al., *Nat. Med.*, **6**, 443-446 (2000)
- 8) G. Cartron, et al., *Blood*, **99**(3), 754-758 (2002)
- 9) R. Gennari, et al., *Clin. Can. Res.*, **10**, 5650-5655 (2004)
- 10) M. Kiyoshi., et al., *Sci. Rep.*, **8**:3955 (2018)
- 11) 田中亨ら、東ソー研究・技術報告、**63**, 77-82 (2019)

