

# 糖鎖改変技術による高機能抗体創出へのアプローチ

星薬科大学 薬学部 機能分子創成化学研究室  
眞鍋 史乃

## 【背景】

医薬品市場において抗体の占める割合は年々増加しており、特に治療用医薬品としてのIgG抗体の需要が高まっている。IgGには、FcのAsn297に普遍的に1対のN-結合型糖鎖が存在する。糖鎖構造はIgG機能に影響を及ぼすことが知られている。コアフコースが欠損することで抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)が50~100倍上昇する

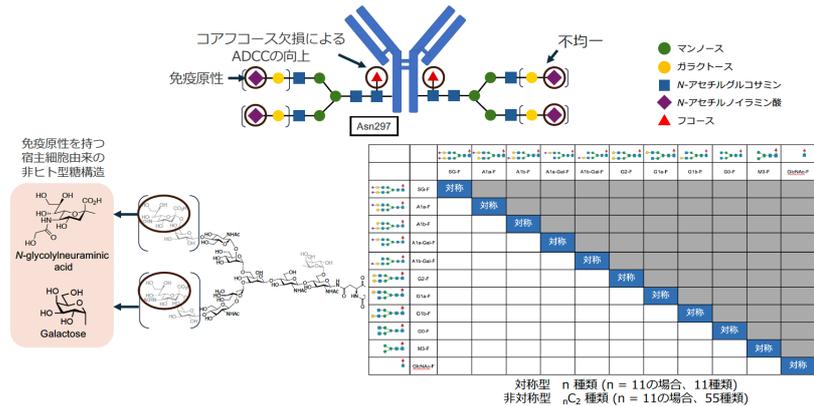


図1：抗体のN-結合型糖鎖の多様性

ことが最も有名な例であるが、糖鎖構造がIgGの体内動態や熱的安定性に影響を及ぼすこと、抗体産生細胞由来のN-グリコシルノイラムニ酸やGal $\alpha$ 1, 3-Galなどの非ヒト型糖鎖構造が免疫原性をもつことも知られている。一方、N-結合型糖鎖は、その生合成経路が多段階であるため、微細構造が異なる不均一な化合物群として存在する(図1)。治療用抗体であっても糖鎖構造の割合は製造バッチごとに異なる。医薬品開発・製造現場においても糖鎖構造制御が重要視されているにもかかわらず、均一な糖鎖を持つIgGが単離・精製できないことから、糖鎖構造とIgG機能との明確な構造活性相関の解明は進んでおらず、IgGの機能向上に向けた糖鎖制御の方向性を打ち出すことが困難な状況にある。

この問題点を解決するため、糖鎖構造が均一なIgGを作製する手法が開発された(L. W. Wang *et al. Nat Protoc.* 2017, 12, 1702.)。すなわち、不均一な糖鎖を還元末端の還元末端のN-アセチルグルコサミンを残してキトビオースの間の結合をendo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (ENGase)を用いて切断する。この糖鎖切断IgGに、加水分解能力を抑えた一方、糖転移能力を保持した改変ENGaseを用いて、均一構造の糖鎖を付加するプロセスである(図2A)。

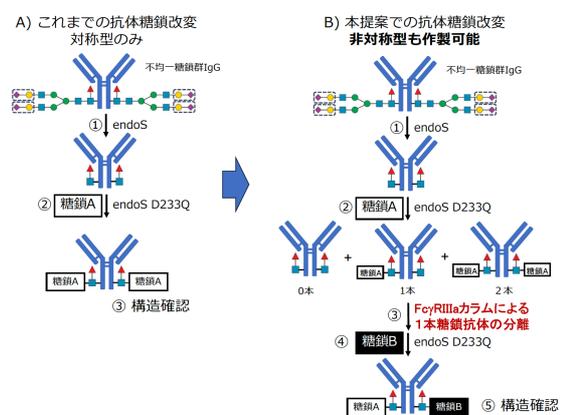


図2：抗体糖鎖改変法

均一IgGは対称型に限られ、大きな制約がある。大部分のIgGでは1対の糖鎖構造が異なる非対称型糖鎖構造をもつが、従来の手法では糖鎖構造の多様性を十分に再現することができない。

## 【研究成果】

### 1. 66種類系統的糖鎖均一トラスツズマブライブラリーの作製

我々は、ADCC解析を目的として開発されたFcγRIIIaアフィニティーカラムクロマトグラフィーにおいて、IgGがもつ糖鎖の本数によりIgGの保持時間が大きく異なることを見出した。糖鎖切断IgG、1本鎖糖鎖IgG、2本鎖糖鎖IgGの保持時間はそれぞれ8.4分、30-31分、51-64分であった。この保持時間の差を利用し、糖鎖切断IgGに糖鎖付加した過程でFcγRIIIaアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより1本鎖糖鎖を単離することができる。単離した1本鎖IgGに異なる構造の糖鎖を付加することで、1対の糖鎖構造が異なる非対称均一糖鎖IgGを作製することに成功した(図2B)。改変ENGaseとして、コアフコースをもつIgGにも糖鎖付加ができるendoS D233Qを用いた。作製したIgGの均一性は質量分析により確認した。この手法を用いて、抗体医薬品としてもっとも広く用いられるトラスツズマブに対して対称型・非対称型を含む66種類の糖鎖均一ライブラリー作製に成功した。

### 2. 糖鎖構造がIgGのADCCに与える影響の解明

レポーターアッセイにより作製したIgGライブラリーのADCC活性を測定した結果、糖鎖を切断したトラスツズマブは極めて弱いADCCを示し、1本鎖糖鎖トラスツズマブは弱いADCCを示した(表1)。一方、ADCCが高い2本鎖糖鎖トラスツズマブとして、対称型糖鎖を持つ1種類および非対称型糖鎖を持つ10種類を同定した。それらはシアル酸がひとつ存在するA1a-Fシリーズに多く存在した。また、ガラクトースの数が増加することでADCCが増強されることが明らかになった。さらに、ガラクトースの数が同じ場合でも、Man α 1-6鎖シリーズG1a-Fの方がMan α 1-3鎖シリーズG1b-FよりもADCCが強いことが示された。同様にシアル酸、ガラクトースの数が同じであってもMan α 1-6鎖シリーズA1a-Fの方がMan α 1-3鎖シリーズA1b-FよりもADCCが強い。これは、Man α 1-6ガラクトース残基がCH2ドメインのLys250と相互作用することや、Man α 1-6鎖と2つのフェニルアラニン残基との間でのCH-π相互作用など、Man α 1-6鎖とIgGのタンパク質部分の複数の相互作用が、FcγRIIIaへの結合に影響を与えると推察された。2つ以上のシアル酸残基が結合するとADCCが弱くなる傾向も認められた。

	SG-F	A1a-F	A1b-F	A1a-Gal-F	A1b-Gal-F	G2-F	G1a-F	G1b-F	G0-F	M3-F	GlcNAc-F
SG-F	3133										
A1a-F	27643	39280									
A1b-F	41017	38193	39547								
A1a-Gal-F	33170	22777	33373	38490							
A1b-Gal-F	28577	35890	38510	29983	36930						
G2-F	38107	44187	40223	37000	37417	42130					
G1a-F	38328	42807	38637	28817	29530	41340	35523				
G1b-F	34820	41317	36523	37573	40503	37167	39343	17620			
G0-F	30937	41557	25007	29507	33773	42567	32157	28753	38633		
M3-F	36403	34967	13400	35940	36080	40213	33367	23283	28880	17303	
GlcNAc-F	11510	23960	11173	15983	13450	28227	18807	8630	6193	5647	11450

表1：糖鎖均一トラスツズマブライブラリーのADCC評価

### 3. 糖鎖構造がIgGの熱的安定性に与える影響の解明

IgGライブラリーの熱的安定性に関して示差走査熱量測定を行った。A1b、A1b-Gal、M3シリーズにおいてTmとΔHの間に正比例の関係があることを見出した(図3)。また、1種類の糖鎖を除くと、A1aおよびA1a-Galにも同様にTmとΔ

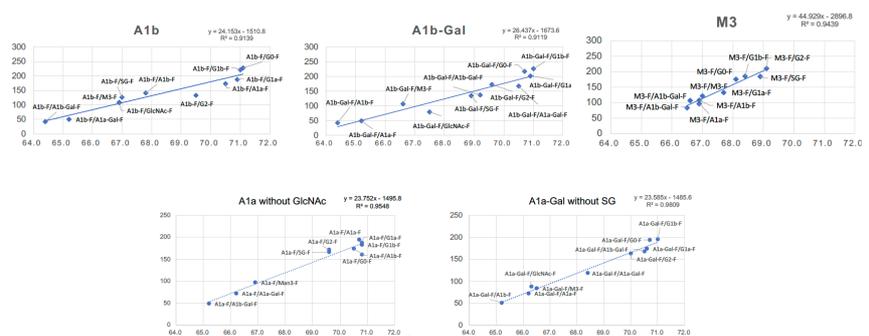


図3：TmとΔHとの比例関係

Hの間に正比例の関係が認められた。これまでのIgGから糖鎖を切り出して行う糖鎖構造とIgG機能の相関研究では、このような関係を明らかにすることはできず、糖鎖が結合した状態でIgG機能を測定することができる我々の手法の優位性が示された。

さらに、シアル酸が存在する場合には、熱的安定性が低下することが明らかになった。この現象は、これまでも議論が行われてきたが、シアル酸が糖鎖の非還元末端に結合することで糖鎖全体の鎖長が長くなり、Fcキャビティー内に糖鎖がおさまりきらずFcの揺らぎを生じるためか、あるいは酸性カルボキシ基の影響によるものであると推察される。

同様にリツキシマブについても44種類からなる糖鎖均一ライブラリーを作製した。糖鎖構造がFcγRIIIa結合に及ぼす影響の傾向は、トラスツマブの場合と一致するわけではないことが確認された。

#### 4. 化学修飾シアル酸官能基修飾によるIgGのFcγRIIIa結合力と熱的安定性への影響評価

シアル酸の熱的安定性に対する影響を明らかにするために、シアル酸のカルボキシ基に様々な官能基を付加することで極性を変化した糖鎖を作製し、これをIgGに付加した後、ADCCに大きく関与するタンパク質であるFcγRIIIaに対する結合力と熱的安定性についての評価を行った。多くの場合、FcγRIIIaへの結合力は低下し、特にアミノ基の場合に顕著であった。一方、Tmについてはほぼ同様の値を示した。今後、さらに化学修飾糖鎖IgGのバリエーションを増やし、その効果をもとにシアル酸の効果についての考察を進める予定である。

#### 【総括】

我々は、有機合成化学と糖鎖生物学を融合させ、新たな学際領域の創成を目指している。本研究では、精密分子設計が可能である有機合成化学の強みを、より高分子量である糖タンパク質へと拡張することに成功した。これまで、有機合成化学の分野では、低分子化合物ライブラリーや糖鎖ライブラリーが作製されてきたが、本研究は、有機化学の概念を基盤として糖タンパク質ライブラリーを精密作製可能であることを初めて示した成果である。

従来、IgGの糖鎖改変においては、ADCCとコアフォースの有無の関係性が注目され、その機能はON/OFFの二極的な視点で論じられてきた。しかし、我々が構築したライブラリーは糖鎖構造を精密に制御可能で、その結果、IgG機能を調節することができる。より詳細な構造活性相関の解析が可能である。さらに、我々が作製した糖鎖均一トラスツマブライブラリー/リツキシマブライブラリーは、世界最大規模を誇るものである。

糖鎖構造と糖タンパク質機能の相関研究の難しさは、糖鎖の不均一性に加えて、従来の解析が糖タンパク質から糖鎖を切り出して行う手法に限定されていた点にある。糖タンパク質は一般的に複数のグリコシル付加位置を持ち、切り出された糖鎖からは糖鎖がどの位置に結合していたかという情報が失われてしまう。このため、切り出された同一の割合からなる糖鎖が異なる結合パターンで存在している可能性を区別することができない。例えば、糖鎖Aと糖鎖Bがそれぞれ50%ずつ存在している場合、それが1対として同一IgG内に共存しているのか、別々の抗体に存在しているのかを判別することはできない。この結合位置情報の欠如が、糖タンパク質構造の正確な決定を妨げ、機能との明確な相関を導き出す障壁となっている。我々の作製した糖鎖均一IgGは、糖鎖付加位置情報をもつままで解析できる利点をもつ。

本研究は、現在の技術では制御が難しい糖タンパク質の糖鎖構造を制御するための端緒となるものであり、今後は、作製したライブラリーを活用し、糖鎖構造がIgGの機能に及ぼす影響を構造生物学見地からも含めて詳細に解明する予定である。抗体以外の糖タンパク質への応用展開も期待される。また、有機合成技術を駆使した糖鎖構造改変を通じ、より高い機能性を有するIgGの創出を目指したい。