

○ 国立がん研究センターとの共同研究

「Influence of N-glycosylation on effector functions for the development of therapeutic antibodies」

(機能分子創成化学研究室 ヒランヤコン メタニー 助教)

(概要)

N-glycosylation of the immunoglobulin G (IgG) is essential for antibody functions. However, the relationship between glycan structure and antibody function is still unclear due to the heterogeneous nature of glycan structure. To reveal the relationship between N-glycan and antibody activities, homogeneous N-glycan carrying IgG is highly desired. Previous N-glycan engineering of IgGs utilizing enzymatic reactions was limited to the IgG with symmetric N-glycans synthesis. This proposal aims to, 1) systematic synthesis of homogeneous symmetric and asymmetric N-glycan carrying IgG; 2) evaluate their biological activity in vitro; 3) investigate the pharmacokinetic profile of glycosylated IgGs by in vivo imaging. Interestingly, our homogeneous glycosylated rituximab showed significant differences in binding affinity compared to native form, indicating the potential for glycan to modulate IgG function. This research strategy offers both mechanistic insights into their biological functions and potential for enhancing therapeutic IgG using glycans.

(研究成果報告)

本研究では、B細胞性非ホジキンリンパ腫治療抗体であるリツキシマブのFc糖鎖構造に着目し、糖鎖均一化抗体の構築とその機能評価を行った。具体的には、糖鎖オキサゾリンをドナー基質とし、改変エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)を用いたトランスグリコシル化反応によって、Fc領域に明確な構造を有する糖鎖を導入した。さらに、FcγRIIIaアフィニティーカラムクロマトグラフィーによる精製・分離操作を組み合わせることで、計36種類からなる糖鎖均一リツキシマブライブラリーの構築を達成した。

得られた各抗体については、抗体依存性細胞傷害活性(antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)において重要な役割を担うFcγRIIIaとの相互作用を、表面プラズモン共鳴(SPR)法により定量的に評価した。その結果、Fc糖鎖構造の違いに応じてFcγRIIIa結合親和性が大きく変動することを明らかにした。

また、これまでに得られていた糖鎖均一トラスツズマブのADCC評価結果との比較を行ったところ、糖鎖構造がIgGのADCCに及ぼす影響には共通した傾向が認められる一方で、抗体ごとに必ずしも同一ではないことが示された。すなわち、Fc糖鎖構造の機能的寄与は抗体の分子背景に依存する可能性が示唆された。

さらに、ライブラリー中からFcγRIIIaに対して高い結合親和性を示す糖鎖改変体および低い結合親和性を示す糖鎖改変体を選抜し、細胞傷害に伴って放出されるLDH(lactate dehydrogenase)を発光シグナルとして検出するアッセイによりADCC活性を評価した。その結果、SPRで得られたFcγRIIIa結合強度とADCC活性との間に明確な正の相関関係が認められた。

加えて、in vivoにおける体内動態を評価するため、糖鎖改変リツキシマブを¹¹¹Inで標識し、CD20陽性腫瘍担持マウスモデルを用いたイメージングおよび体内分布解析を実施した。その結果、糖鎖構造

の違いが抗体の体内分布特性にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

以上の結果より、本研究は、Fc 糖鎖構造の精密制御が抗体医薬のエフェクター機能および体内動態の最適化に資することを示すものであり、次世代抗体医薬の合理的分子設計に向けた重要な基盤知見を提供するものである。