



構造活性相関部会・ニュースレター <1 October, 2018>

# *SAR News No.35*

---

## 「目次」

---

### //// Perspective/Retrospective ////

抗体の NMR 研究の趋向と展望

加藤晃一、谷中冴子 … 1

### //// Cutting Edge ////

抗体医薬品開発における質量分析技術

尾山博章、内山 進 … 8

### //// Activities ////

#### <報告>

構造活性フォーラム 2018 「創薬におけるビッグデータの活用と AI 戦略」開催報告

岡島伸之 … 16

第 11 回薬物の分子設計と開発に関する日中合同シンポジウム開催報告

赤松美紀 … 18

#### <会告>

第 46 回構造活性相関シンポジウム 会告 … 19

## ///// Perspective/Retrospective /////

## 抗体の NMR 研究の趨勢と展望

自然科学研究機構生命創成探究センター

加藤 晃一、谷中 冴子

## 1. はじめに：まずは回顧的な話から

今から 30 年も前のことになるが、筆者の一人（加藤）は、薬学の博士論文のテーマとして、NMR を用いた抗体の高次構造研究を選んだ。（というより、それが研究室の実質的に唯一のテーマであった。）当時の指導教官であった荒田洋治教授は、多発性骨髄腫の患者由来の M タンパク質（単クローン性免疫グロブリン）やベンスジョーンズタンパク質（免疫グロブリン軽鎖）を対象にして、1 次元  $^1\text{H}$  NMR 分光法を用いた抗体の構造研究に取り組んでいた。NMR 分光法は、原理的には水溶液中における生体高分子の動的 3 次元構造を原子レベルの分解能で提供し得る。しかしながら、対象分子が大きくなるとピークの重なり合いと、個々のピークの線幅の増大が甚だしくなり、解析はおろか観測自体が困難となる。免疫グロブリン G (IgG) は分子量 15 万におよぶ高分子量タンパク質であるために、これを NMR の対象とすることは、かなりのチャレンジである。しかも、試料としていた IgG のアミノ酸配列はかならずしも明らかではなかった。普通に考えれば、こうした研究プロジェクトは無謀である。しかしながら、「アミノ酸配列がわからなければタンパク質の構造研究ができないなどというのは、凡人の言うことだ。」というのが指導教授の教えであった。

幸い、加藤はアミノ酸配列が知れたマウスのモノクローナル抗体を題材にすることが許されたので、詳細な高次構造研究の道が開けたと思った。とはいえ、“分子量の壁”を克服しなければ抗体の構造研究は進展しない。本稿では、こうした経緯を踏まえて筆者らが取り組んできた、抗体の NMR 研究がどのように進展し、抗体医薬の開発に活用し得るか、その動向と展望について述べる。

## 2. 鍵は安定同位体標識

NMR による抗体の分子量の壁を克服する手段は、試料の安定同位体標識である[1,2]。加藤が荒田研でまず取り組んだのは、抗体産生細胞の培養系を利用して抗体中の芳香族アミノ酸残基の特定の部位に重水素標識を施すアプローチである[3]。重水素標識により、 $^1\text{H}$  NMR スペクトル中で余分なピークを消去すれば、残ったピークの観測が容易になるという発想に基づく。さらに、重水素に置き換えることにより  $^1\text{H}$  NMR の主要な緩和の源となる磁気双極子-双極子相互作用は抑制されるので、残余のピークはシャープになり、いっそう観測しやすくなることが期待される。ただし、こうして観測された  $^1\text{H}$  NMR ピークが配列上何番目のアミノ酸残基に由来するのかという帰属を確定することはかならずしも容易ではない。

その一方で、タンパク質主鎖に由来する NMR 信号は配列特異的な帰属を実現し得る可能性が高い。加藤は、安定同位体標識技術を活用したタンパク質の NMR 研究の第一人者である東京都立大学（当時）の甲斐正恒博士に相談し、アミノ酸選択的な主鎖カルボニル炭素の  $^{13}\text{C}$  標識を抗体の NMR 解析に応用することを試みた。幸いなことに、この試みは功を奏し、完全長の IgG を対象にしても個々のアミノ酸残基に由来する信号を観測可能であることが判明した[4]。カルボニル炭素がシャープな  $^{13}\text{C}$  ピークを与えるのは主要な緩和の要因となる磁気双極子-双極子相互作用をもたらす  $^1\text{H}$  から隔絶しているためである。しかも観測されたピークを配列特異的に帰属することができることもわかった。帰属のやり方はここでは詳しく述べないが、原則的に 1 つのピークを帰属するのに数リットル規模の細胞培養を行うという、かなり手のかかる方法である。しかし、一度帰属の確定したシグナルは抗体の高次構造や相互作用に関する情報を原子レベルで

提供する有用なプローブとなる。こうしたアプローチ法を開拓したことにより、加藤は兎にも角にも薬学博士の学位を取得することができた。

ところで、なぜ安定同位体標識を行うのにもっと簡単なシステムを使わなかったのかという疑問を呈する読者もおられるかもしれない。例えば、大腸菌を  $^{13}\text{C}$  標識グルコースと  $^{15}\text{N}$  標識アンモニウム塩から構成される最少培地で培養すれば、タンパク質の全ての炭素を  $^{13}\text{C}$  で全ての窒素を  $^{15}\text{N}$  で一様に標識することが可能である。そうすれば、多次元 3 重共鳴 NMR 計測によって系統的な信号帰属の道も開かれる。ただし、大腸菌で発現した組換えタンパク質は糖鎖修飾を受けていないいわば裸のタンパク質である。IgG は Fc 領域に 1 対の N 型糖鎖の結合部位 (Asn297) を保存した典型的な糖タンパク質である。しかも、これらの糖鎖は IgG が補体や Fcγ 受容体 (FcγR) との相互作用を通じたエフェクター機能の発動に不可欠な役割を担っている。すなわち、Fc から糖鎖を取り除くと IgG のエフェクター機能は失われてしまう。したがって、抗体の機能発現メカニズムを探究する上で糖鎖の存在を無視することはできない。実際、糖鎖を除去すると、FcγR の結合部位にあたるヒンジ領域およびその近傍の立体構造が崩れることが NMR を用いた解析から明らかとなった[5]。このように、培養動物細胞を利用した抗体産生系を当初から用いていたことは、後にエフェクター機能発動における糖鎖の役割を分子構造論の観点から理解するうえで大いに役に立っている。

動物細胞は大腸菌のような最少培地で育てることができないが、無血清培地中の炭素源と窒素源 (すなわちグルコースやアミノ酸など) を全て安定同位体標識体に置き換えて細胞培養を行えば、ポリペプチド鎖も糖鎖も全て  $^{13}\text{C}$  と  $^{15}\text{N}$  で標識することが可能である。こうすることによってピークの帰属を確定したヒト IgG の Fc 領域の二次元 NMR スペクトルを図 1 に示す。ちなみに、この帰属が確立したのは最近のことである[6]。

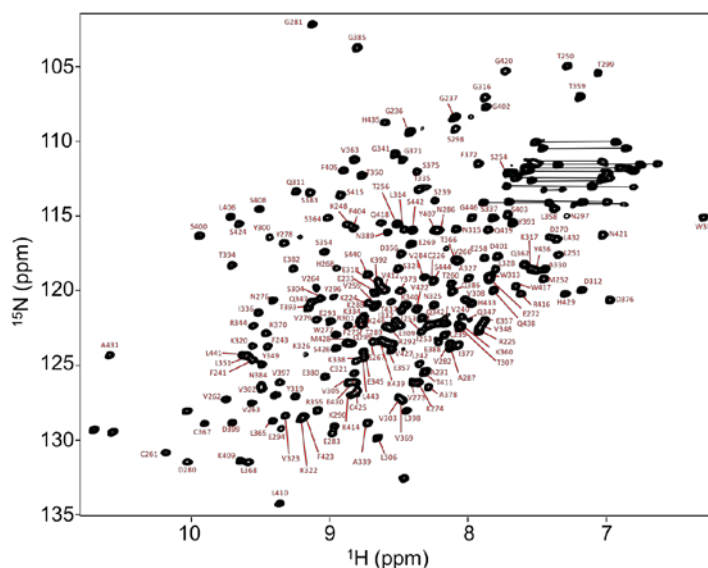


図 1. ヒト IgG-Fc の二次元 NMR スペクトル

動物細胞培養系を活用して  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  標識を施したヒト IgG1-Fc の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル。(引用文献 6 より改変して転載)

動物細胞以外でも、真核細胞を利用すれば糖鎖修飾を受けた抗体を発現することは可能である。実際、植物や昆虫を用いた抗体の産生系が作り出されている。ただし、糖鎖修飾は生物種に特徴的であるので、これらの産生系を使って作り出した抗体の糖鎖は、ヒト抗体の糖鎖とは明確に異なっている。筆者のグループではタバコやカイコで発現した抗体に代謝的に安定同位体標識する方法も確立しており、糖鎖修飾の差異が Fc 領域の高次構造に及ぼす影響を検出することができている[7]。NMR を用いたこうした方法は、抗体医薬品の評価等に活用できるものと考えている。

ここまで高分子量タンパク質を対象とした NMR 戦略として  $^{13}\text{C}$  および  $^{15}\text{N}$  標識による観測シグナルの感度向上、重水素標識による不要シグナルの消去と残余シグナルの先鋭化をアミノ酸選

択的に行うことの有効性を述べてきた。これら 2 つの長所を組み合わせることにより、抗体の NMR の可能性は一層広がる。図 2 は、ロイシン残基のメチル基を選択的に  $^{13}\text{C}$  標識した完全長 IgG の二次元 NMR スペクトルである。適切な重水素標識を組み合わせることにより、この抗体中に存在する 42 個の非等価なロイシン残基のメチル基由来のシグナルが全て観測されている[8]。こうしたプローブの活用例については後ほど述べる。

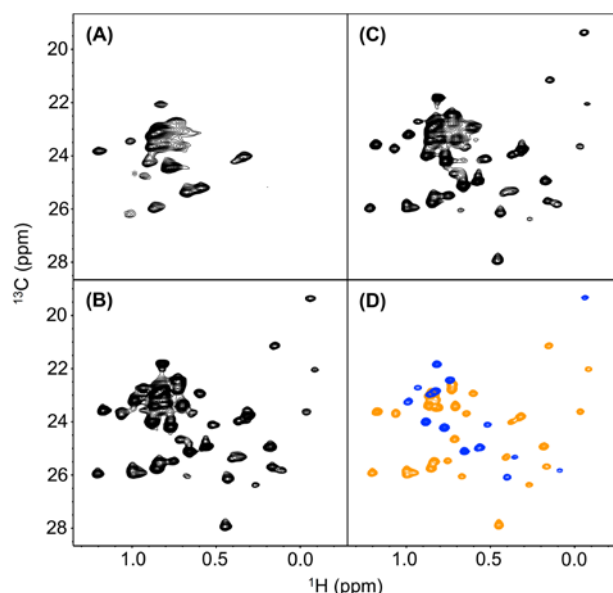


図 2. マウス IgG のメチル TROSY スペクトル

- (A)  $[\delta 2\text{-}^{13}\text{C}]$ ロイシン、(B)  $[\delta 2\text{-}^{13}\text{C}; \text{H}\alpha, \text{H}\beta, \text{H}\gamma, \text{H}\delta 1\text{-}^2\text{H}_7]$ ロイシン、  
 (C)  $[\delta 2\text{-}^{13}\text{C}; \text{H}\alpha, \text{H}\beta, \text{H}\gamma, \text{H}\delta 1\text{-}^2\text{H}_7]$ ロイシンと $[^2\text{H}_7]$ グルコースで代謝標識したマウス IgG2b。  
 (D)  $[\delta 2\text{-}^{13}\text{C}; \text{H}\alpha, \text{H}\beta, \text{H}\gamma, \text{H}\delta 1\text{-}^2\text{H}_7]$ ロイシンと $[^2\text{H}_7]$ グルコースで標識したマウス IgG2b より単離した Fab (オレンジ)と Fc (青)。(引用文献 8 より転載)

### 3. NMR で見る抗体分子のダイナミクス

NMR の特長は何と言っても生体高分子のダイナミックな構造情報をもたらす点である。例えば、一般に抗体分子の柔構造の源と考えられているヒンジ領域が、実際には柔軟な部分と堅固な部分が交互に連なったモザイク構造を有していることが NMR の緩和解析から明らかとなっている。さらに、Fab 部分が多価の抗原で架橋され固定されても Fc 部分は運動性を保っていることも NMR 解析の結果より明らかとなっている[1]。

Fc 領域の内部運動はどうであろうか。先に、Fc に結合している糖鎖が抗体のエフェクター機能に不可欠であると述べたが、この糖鎖の根本にあるフコース残基だけを取り除くと FcγRIII に対する親和性が高まり、抗体依存性細胞性細胞傷害活性 (ADCC) が劇的に向上する[9]。これはポテリジェント技術として抗体医薬に実装されている。筆者らの構造生物学的研究によって、そのメカニズムは明らかとなりつつある。Fc と FcγRIII の間の相互作用はタンパク質部分の間の相互作用に加えて両者の糖鎖同士の相互作用が寄与しており、フコースは立体障害によって糖鎖同士の相互作用を妨げるのである[10]。さらに、フコースは近傍のチロシン残基 (Tyr296) の芳香環と分子内で相互作用していることが NMR 解析の結果からみてとれる (図 3)。このチロシン残基は FcγRIII との結合に与っているため、これがフコースと分子内で相互作用していることは FcγRIII との相互作用、ひいては ADCC 活性に不利に働く。これが現時点での筆者らの見解であり、分子動力学 (MD) 計算の結果もこれを支持している[11]。MD 計算の結果は、これらタンパク質の糖鎖やアミノ酸残基側鎖が水溶液中でダイナミックに揺動していることも示している。今後、こうした構造揺らぎを実験的に定量的に評価するうえでも NMR はますます重要な役割を果たすものと期待される。

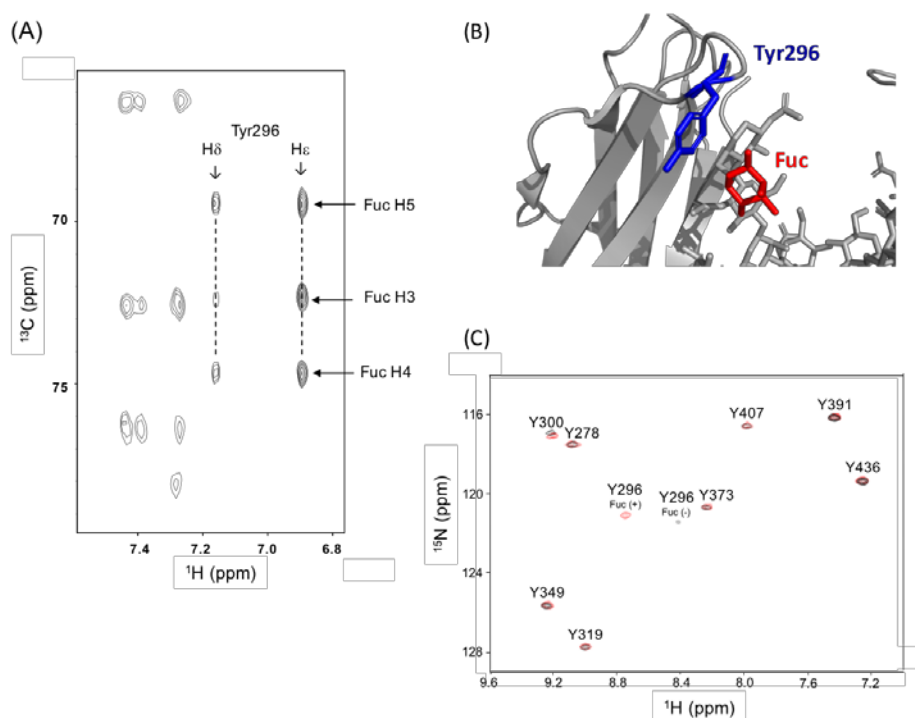


図 3. ヒト IgG-Fc の分子内相互作用のダイナミクス

(A) 糖鎖を  $^{13}\text{C}$  標識したヒト IgG1-Fc の二次元 HSQC-NOESY スペクトル。抗体の Tyr296 とフコース残基は近接し、NOE が観測される。(B) Fc の結晶構造中における Tyr296 (青) とフコース残基 (赤)。(C)  $^{15}\text{N}$ チロシンを用いて標識したヒト IgG1 のフコシル化 Fc (赤) と非フコシル化 Fc (黒) の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル。非フコシル化 Fc の Tyr296 ピークは化学シフト変化とともに化学交換に由来する強度減弱が見られる。(引用文献 7 より転載)

抗体の構造揺らぎを評価することによって、その機能向上をタンパク質工学的に実現することも可能である。天然型の抗体は、必ずしも高親和性かつ高選択性であるとは限らない。そのため、薬効の高い抗体医薬を作製できる合理的な設計法が求められているが、現状ではそうした方法論は開発途上である。抗原-抗体相互作用は、本来は動的で複雑な過程を経るが、従来の抗体の機能改変は静的な結晶構造がもたらす情報に依存している部分が多い。NMR のもたらす動的な構造情報は抗体の高機能化を目的とする分子設計に貴重な情報をもたらすに違いない。荒田研究室では、嶋田一夫博士が中心となって抗体の超可変ループのコンフォメーションの揺らぎが抗原認識に密接に関わっていることを示してきた[1]。最近、筆者の一人である谷中は、抗体分子中で抗原とのコンタクトに直接与らない部位の動的性質に着目して、その制御によって抗体の抗原親和性を向上するアプローチ法を開拓している[12]。そのために、抗リゾチーム抗体 HyHEL-10 の可変領域フラグメント (Fv) をモデルとして緩和分散法を用いた NMR 解析を行った。この方法は、タンパク質の分子認識に関わるマイクロ秒～ミリ秒オーダーの分子構造動態に関する情報を提供することができる (図 4)。緩和分散解析の結果、抗原と結合する前の状態では HyHEL-10 の可変領域の立体構造は広範囲に渡って大きく揺らいでいるのに対し、リゾチームとの複合体を形成した状態ではこうした揺らぎが抑えられているということが明らかになった。そこで、抗原結合前の状態の揺らぎを抑えて結合後の状態に近づけることで、親和性を向上させることができないかというのが谷中の着想である。揺らぎの程度を反映する化学交換に由来する緩和速度 ( $R_{\text{ex}}$ ) を指標とし、超可変領域以外に位置し、なおかつ嵩高い側鎖を持つアミノ酸残基の中で大きな  $R_{\text{ex}}$  を示した残基をアラニンに置換することで、揺らぎを抑える方針を取った。最終的に、揺ら



ぎの度合いが大きかった 32 残基の中から 10 残基を選出してアラニン置換を導入した結果、2 つの変異体で親和性の向上がみとめられた。それらの変異体について  $R_{ex}$  を計測したところ、いずれも  $V_H$  ドメインの構造揺らぎが顕著に低下していた。この結果は、抗体分子中で抗原結合に直接関わらない部位に変異を導入することを通じて抗原認識部位の揺らぎを制御し、これにより抗原に対する親和性を向上させ得ることを示すものである。

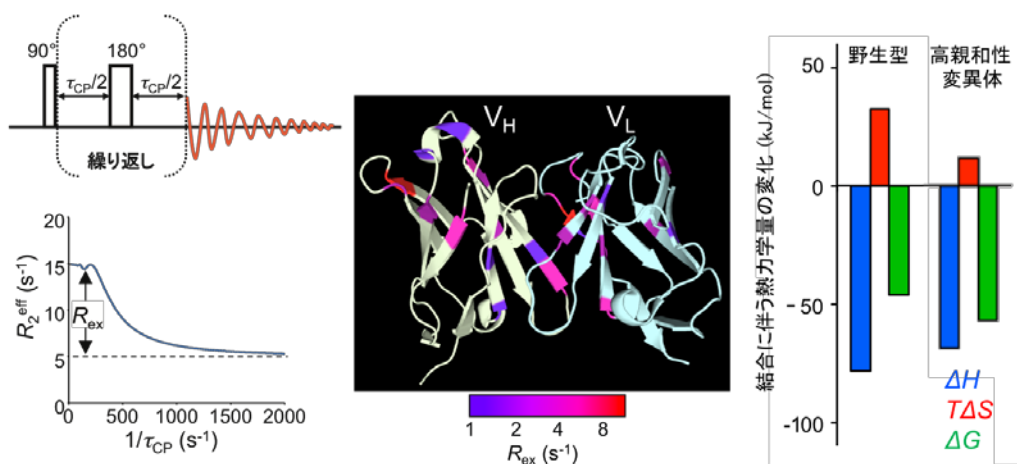


図 4. 緩和分散法を用いた抗体の親和性向上

図左上：緩和分散測定のためのパルス系列の概略

図左下：化学交換を示すピークの緩和プロファイル

図中央：抗原非存在下における HyHEL-10 の Fv の  $R_{ex}$  のマッピング

図右：野生型およびリゾチームに対する親和性を高めた変異型 HyHEL-10 の Fv の等温滴定型カロリメトリーによる親和性の評価

(引用文献 12 より改変して転載)

#### 4. 血清環境における抗体間相互作用の解析

液性免疫という言葉に端的に示されるように、抗体が機能する主な舞台は血液中である。分子が混み合った血中環境では、様々なタンパク質同士が衝突しあい、希釈溶液中では無視されてきた弱い相互作用が増強される。このような非特異的相互作用は抗体医薬をはじめとするバイオ医薬品を設計開発する際に考慮すべき要因となる。しかしながら、抗体の構造機能研究あるいは抗体医薬の開発において、血中環境と希釈溶液中での相互作用の違いにはこれまであまり目が向けられてこなかった。筆者らは、血中の混み合い環境での抗体と血中因子との特異的あるいは非特異的な相互作用を明らかにするための第一歩として、血清環境中における抗体の分子間相互作用を、安定同位体標識を活用した NMR 法を利用して探査するアプローチ法を開拓しつつある[8, 13]。

部位特異的に重水素と  $^{13}\text{C}$  で標識したマウス IgG を用いて、ヒト血清中でのシグナルを観測したところ、Fab と Fc 双方に由来する多くのシグナルにピーク強度の減弱がみとめられた(図 5)。このことは、マウス IgG が血清中の成分と何らかの相互作用をしていることを意味する。血清中の主要なタンパク質成分はアルブミンとポリクローナル IgG である。そこで、これらの血清タンパク質と安定同位体標識 IgG との相互作用を検討したところ、IgG は血清中のポリクローナル IgG の Fab 領域と相互作用することが明らかとなった。これらの結果は、特定の抗原によって感作されていない血液環境においても、内在するポリクローナル IgG によってマウス IgG が認識されることを意味する。特に、ピーク強度の減弱が Fab 領域に由来する信号に顕著であったことは興味深い。当然のことながら同様の実験はヒト化抗体や完全ヒト抗体を対象にしても実施可能である。血清タンパク質との相互作用は、抗体が抗原やエフェクター分子との結合に対しても影響を与えることは十分に考えられる。

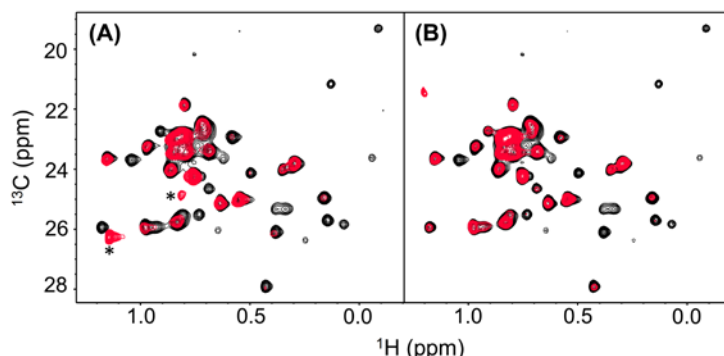


図 5. 血液環境下でのマウス IgG のスペクトル変化

黒は緩衝溶液中でのマウス IgG2b のメチル TROSY スペクトル。(A)赤はヒト血清中のマウス IgG2b のスペクトル。アスタリスクは血清に由来する成分を示している。(B)赤はヒト血清由来のポリクローナル IgG-Fab 存在下でのマウス IgG2b のスペクトル。(引用文献 8 より転載)

## 5. おわりに

本稿で述べたように、安定同位体標識を基軸とした NMR 計測によって抗体の高次構造と相互作用を詳細に解析することが可能となった。抗体の抗原認識と FcγR との結合はいずれも水溶液中における抗体の構造ダイナミクスが深く関わっている。これらの機能はいずれも複数のドメインの協働によって実現されている。さらに抗体の分子全体を広げて見れば、異物の認識を契機としてエフェクター機能の発動へと連なる過程は多数のドメインと糖鎖から構築される柔構造を舞台として進展していることがみてとれる。抗体の柔構造の裡に張り巡らされた隠されたネットワークを焙り出すことは、タンパク質工学的発想に基づく抗体の機能改変の新たな指針を提供するであろう。そこでは NMR が一層重要な役割を演じるはずである。とりわけ、中性子小角散乱や高速原子間力顕微鏡など現在活発な発展を遂げている分子構造動態の計測技術と NMR 分光法との統合がバイオ医薬品の開発において革新的な情報をもたらすことが期待される。

さらに、本研究で開発した夾雑不均一系を対象にした NMR 観測手法は、バイオ医薬品の評価や血中環境での機能発現の実態解明に向けて様々な応用展開が期待される。血清環境は生理的状態や病態・病歴によって変動し得るので、患者によって異なるものと思われる。このような複雑な多成分系を対象にした NMR 解析を行うには、アミノ酸配列が不明のままタンパク質の構造研究を敢行するようなセンスが必要なのかもしれない。こうしたアプローチ法が成熟すれば、テーラーメイド化を志向したバイオ医薬品の次世代化の展望が開けるであろう。

## 参考文献

- [1] Arata, Y., Kato, K., Takahashi, H., Shimada, I. Nuclear magnetic resonance study of antibodies: A multinuclear approach, *Methods in Enzymology* **239**, 440-464 (1994).
- [2] Kato, K., Yamaguchi, Y., Arata, Y. Stable-isotope-assisted NMR approaches to glycoproteins using immunoglobulin G as a model system, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **56**, 346-359 (2010).
- [3] Kato, K., Nishimura, Y., Waelchli, M., Arata, Y. Proton nuclear magnetic resonance study of a selectively deuterated mouse monoclonal antibody: Use of two-dimensional homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy, *J. Biochem.* **106**, 361-364 (1989).
- [4] Kato, K., Matsunaga, C., Nishimura, Y., Waelchli, M., Kainosho, M., Arata, Y. Application of  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy to molecular structural analyses of antibody molecules, *J. Biochem.* **105**, 867-869 (1989).

- [5] Yamaguchi, Y., Nishimura, M., Nagano, M., Yagi, H., Sasakawa, H., Uchida, K., Shitara, K., Kato, K. Glycoform-dependent conformational alteration of the Fc region of human immunoglobulin G1 as revealed by NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta –General Subjects* **1760**, 693-700 (2006).
- [6] Yagi, H., Zhang, Y., Yagi-Utsumi, M., Yamaguchi, T., Iida, S., Yamaguchi, Y., Kato, K. Backbone  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{15}\text{N}$  resonance assignments of the Fc fragment of human immunoglobulin G glycoprotein, *Biomol. NMR Assign.* **9**, 257-260 (2015).
- [7] Kato, K., Yanaka, S., Yagi, H. Technical basis for nuclear magnetic resonance approach for glycoproteins, *Experimental Approaches of NMR Spectroscopy* (The Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan ed.), Springer Nature Singapore, 415-438 (2018).
- [8] Yanaka, S., Yagi, H., Yogo, R., Yagi-Utsumi, M., Kato, K. Stable isotope labeling approaches for NMR characterization of glycoproteins using eukaryotic expression systems, *J. Biomol. NMR*, **71**, 193-202 (2018).
- [9] Jeffris, R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 226–234 (2009).
- [10] Mizushima, T., Yagi, H., Takemoto, E., Shibata-Koyama, M., Isoda, Y., Iida, S., Masuda, K., Satoh, M., Kato, K. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans, *Genes Cells* **16**, 1071-1080 (2011).
- [11] Sakae, Y., Satoh, T., Yagi, H., Yanaka, S., Yamaguchi, T., Isoda, Y., Iida, S., Okamoto, Y., Kato, K. Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its interaction with Fc $\gamma$  receptor IIIa, *Sci. Rep.* **7**, Article number: 13780 (2017).
- [12] Yanaka, S., Moriwaki, Y., Tsumoto, K., Sugase, K. Elucidation of potential sites for antibody engineering by fluctuation editing, *Sci. Rep.* **7**, Article number: 9597 (2017).
- [13] Yanaka, S., Yamazaki, T., Yogo, R., Noda, M., Uchiyama, S., Yagi, H., Kato K. NMR detection of semi-specific antibody interactions in serum environments, *Molecules* **22**, 1619 (2017).



## //// Cutting Edge ////

## 抗体医薬品開発における質量分析技術

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻高分子バイオテクノロジー領域

尾山 博章、内山 進

## 1. はじめに

抗体はヒトの免疫を担うタンパク質であり、生体防御において重要な役割を果たす。抗体を医薬品として用いる抗体医薬品はがんやリウマチなどの様々な病気の治療に有効であり、現在までに日欧米で 50 品目を超える抗体医薬品が承認・販売されている[1]。

一方で、抗体は分子量が大きく複雑な構造を持つタンパク質であり、高次構造のわずかな変化が生物学的機能に影響を及ぼすため品質管理が重要となる。抗体の品質に影響する要因として、糖鎖付加やジスルフィド結合の形成などの翻訳後修飾だけでなく、精製や製剤化の過程で起こる化学的修飾（人為的修飾）や、製造後の輸送や保存の段階でかかるストレスも考慮する必要がある。

ここでは、抗体医薬品開発および品質管理において有用な質量分析の使用例を目的別に紹介する。従来、質量分析は、タンパク質やその断片の質量から配列の確認や同定に使われることが多かったが、様々な手法が開発され、近年はタンパク質複合体の化学量論比やタンパク質の立体構造も質量分析により分析されている。以下にそれぞれの手法を説明するとともに、実際に使用する際のサンプル必要量といった情報も記載しつつ、最新の研究動向について紹介する。

## 2. 抗体医薬品開発における質量分析の役割

質量分析の結果から抗体の様々な情報が得られる。具体的には、配列、糖鎖修飾、化学修飾、さらには立体構造情報までも取得可能である。質量分析の性能向上により、抗体医薬品開発で必要となる分析項目の多くが質量分析でカバー出来るようになってきている。実際、厚生労働省が公表している「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス」[2]には抗体医薬品開発において明らかにすべき測定項目が明記されているが、図 1 に示したように、その多くが質量分析により解析可能で、質量分析が抗体医薬品開発において大きな役割を担っていることが分かる。

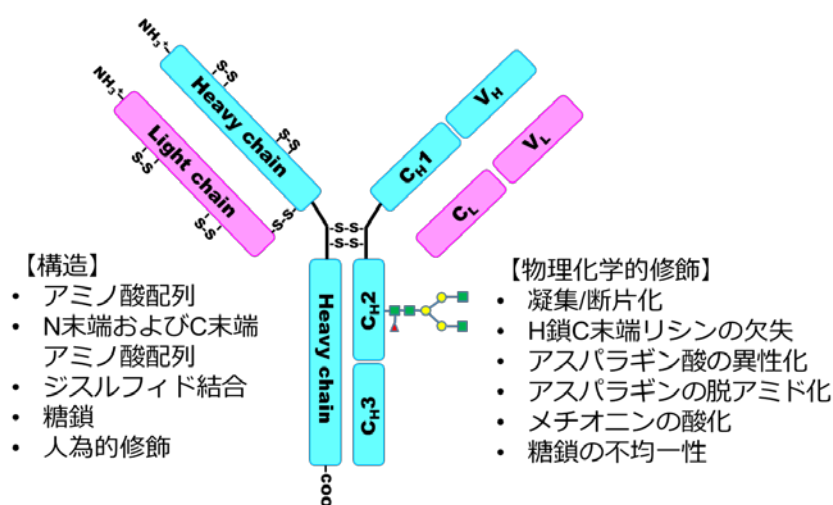


図 1. 抗体医薬品の特性解析において、質量分析により測定できる項目([2]を改変)

加えて、質量分析は微量なサンプル量で測定が可能である。各質量分析手法のサンプル必要量については後述するが、技術の進歩に伴い数マイクログラムのサンプル量でも質量分析が可能となった。抗体などのバイオ医薬品は生産コストが高く、研究開発コストを考えると微量で測定できることは重要である。

次項では目的別に、抗体の特性解析に有用な質量分析手法を紹介する。

### 3. 抗体の特性解析に有用な質量分析を利用した解析手法

本稿で紹介する、抗体の分析に用いることができる質量分析を利用した解析手法を表1にまとめた。なお、ほとんどの手法において、オンラインで液体クロマトグラフィー（LC）を用いて試料中に含まれる塩などを除去し、測定対象のタンパク質やペプチドを分離・濃縮後に質量分析に供する手順を経るが、本稿ではLCの詳細についての記載は省いた。

表1. 抗体の分析に用いることができる主な質量分析を利用した解析手法

| 質量分析手法                                         | 目的                         | 概要                                                |
|------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------|
| 3.1 ペプチドマッピング法<br>(ボトムアップアプローチ)                | 配列の同定<br>化学修飾配列の決定と定量      | 抗体を酵素処理し、ペプチドに分解したのちに質量を測定、抽出イオンクロマトグラフの強度等により定量  |
| 3.2 サブユニット解析法<br>(ミドルアップアプローチ/<br>ミドルダウンアプローチ) | 化学修飾の有無と定量                 | 抗体を酵素処理し、6つの断片に分解したのちに質量を測定<br>MS/MSによる内部配列の解析も可能 |
| 3.3 インタクト解析法<br>(トップダウンアプローチ)                  | 化学修飾の有無と定量                 | 抗体全長そのままの質量を測定                                    |
| 3.4 ネイティブ質量分析法                                 | 複合体の質量の測定<br>化学量論比の同定      | 抗体複合体を穏やかに脱水しながらイオン化し非共有結合を維持したまま質量を測定            |
| 3.5 サイズ排除クロマトグラフィー-質量分析法<br>(SEC-MS)           | サイズによる分離<br>質量の測定          | 抗体サンプルをSECでサイズ別に分離した後、質量を測定                       |
| 3.6 キャピラリー電気泳動-質量分析法 (CE-MS)                   | 電荷による分離<br>質量の測定           | 抗体サンプルを電気泳動で電荷別に分離した後、質量を測定                       |
| 3.7 糖鎖解析                                       | 糖鎖の結合位置の決定<br>糖鎖構造の決定      | 抗体を酵素処理し、糖付加ペプチドの質量を測定                            |
| 3.8 水素重水素交換質量分析法 (HDX-MS)                      | 高次構造変化位置の決定<br>複合体のエピトープ決定 | 抗体のアミド水素を重水素化し、酵素処理でペプチドに分解した後、質量を測定              |

略記

MS: Mass spectrometry, 質量分析

MS/MS: タンデム質量分析

SEC: Size exclusion chromatography, サイズ排除クロマトグラフィー

CE: Capillary electrophoresis, キャピラリー電気泳動

HDX: Hydrogen deuterium exchange, 水素重水素交換

次節からは表1の質量分析手法それぞれについて、簡単な説明と抗体への応用を紹介する。

#### 3.1 ペプチドマッピング法, ボトムアップアプローチ

ペプチドマッピングはタンパク質をトリプシンなどの酵素でペプチドに分解し、ペプチド単位で質量分析を行うことでタンパク質の一次構造を解析する手法である。ペプチド単位の結果をつなぎ合わせて全長の一次構造情報を得るため、ボトムアップのアプローチとよばれる。ほぼ100%のカバレッジで配列情報を得ることができ、アミノ酸配列の確認や糖鎖付加など翻訳後修飾の解析が可能である。また化学修飾前後のサンプルにおいて、ペプチドマッピングの結果を比較することで化学修飾を受けている部位を特定できる[3,4]。抗体における利用例として、化学修飾部位の同定とジスルフィド結合位置の同定を紹介する。

抗体は製剤化された後も、医薬品として輸送・保存される段階で熱や光、振動によるストレスを受ける。抗体が受けやすい化学修飾として知られているのが、メチオニンの酸化である。メチオニンの酸化は抗体のエフェクター機能を低下させたり[5]、血中半減期を短くさせたりと[6]、

薬効への影響が大きい化学修飾であるため、メチオニン酸化が起こりにくい条件で保存する必要がある。条件の異なる方法で保存した抗体についてペプチドマッピングを行い、メチオニンが酸化を受けている割合を比較することで、適切な保存条件を選択できる[7]。

抗体のフォールディングや安定性に関与する翻訳後修飾の1つに、ジスルフィド結合の形成がある。誤った位置でのジスルフィド結合の形成は抗体の安定性を低下させる場合があるため[8]、正しい位置でのジスルフィド結合形成の確認が必要となる。非還元サンプルと還元サンプルでペプチドマッピングの結果を比較しジスルフィド結合の位置を特定する手法が従来から利用されてきたが、Collision Induced Dissociation (CID)や Electron Transfer Dissociation (ETD)などのMS/MS測定を組み合わせることで高い正確性で位置を特定できるという報告もなされている[9]。

### 3.2 サブユニット解析, ミドルアップアプローチ/ミドルダウンアプローチ

サブユニット解析は、酵素などでタンパク質をサブユニットまで分解し、ペプチドより大きい分子量をもつサブユニット断片について質量分析を行い、断片情報を組み合わせてタンパク質の一次構造情報を得る（ミドルアップアプローチ）、さらに、各断片について、CID や ETD のような MS/MS 解析を行うことで内部配列の解析を得る（ミドルダウンアプローチ）手法である。抗体を例にとると、IdeS という酵素による分解の後、還元処理を行い、1つの抗体を2本ずつのFd, LC, Fc/2 というサブユニット単位に分解した後、質量分析を行う。ペプチドマッピングが1つの抗体を数残基から数十残基程度のペプチド数百本にまで分解するのに対して、サブユニット解析は1つの抗体を25 kDa程度の断片6つに分解する。

サブユニット解析はペプチドマッピング法と比較すると、修飾部位の特定は難しく、配列のカバー率は劣る。ただし、IdeS による抗体のヒンジ領域下部での切断反応は迅速に行うことができ、ハイスループットでの評価を行うことができるという利点がある[10, 11]。例えば、IdeS により30分で抗体の消化を行い、酸化部位を特定した論文が報告されている[12]。

### 3.3 インタクト解析, トップダウンアプローチ

インタクト解析は、タンパク質をそのまま、あるいは還元処理後のペプチドについて質量分析を行う手法であり、一次構造の簡便な確認方法である。MS/MS 解析により配列情報の一部を得ることが可能で、トップダウンアプローチとよばれる。組換えタンパク質の一次構造確認や糖鎖修飾の分布状態の把握を目的に利用される[13]。

抗体におけるインタクト解析はMS/MS解析で全長抗体をフラグメンテーションさせ、得られたイオンを質量分析することで測定を行っている。サンプル調製の過程が少ないため、ペプチドマッピング法においてサンプル調製中に起こりうる化学修飾を防ぐことができる。一方で、主流となっているフラグメンテーション方法では配列のカバレッジが低いことが欠点である。これを解決すべく、193 nm の紫外線による光解離法を用いる方法[14]が開発されているが、未だに30~40%程度のカバレッジが限界となっている。

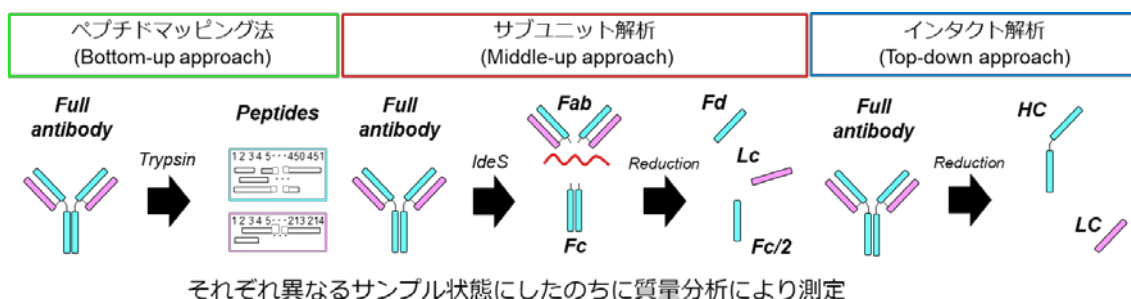


図2. ペプチドマッピング法、サブユニット解析、インタクト解析のサンプル調製

以上、3.1, 3.2, 3.3 で述べた手法はタンパク質をそれぞれペプチド、サブユニット、インタクトと化学的に異なる性質をもつ状態に変えて質量分析を行う手法である。一般的にはペプチドマッピングがよく使用されているが、短時間で測定を行いたい場合や不安定な翻訳後修飾を確認したい場合にはサブユニット解析やインタクト解析が有効である。サンプルの性質や測定目的に応じて適した方法を選択する必要がある。

### 3.4 ネイティブ質量分析

ネイティブ質量分析は、水素結合や疎水性相互作用などの非共有結合を介して形成されたタンパク質複合体を破壊すること無く、そのままの状態で複合体の質量を測定する手法である。利用可能な緩衝剤が限られ、また、サンプルの溶解度が低い場合や不均一性が高い場合には測定が難しいものの、タンパク質複合体を壊さずに測定できるため、複合体を形成するユニットの化学量論を決定できる強力な手法である[15, 16, 17]。抗体への応用例としては、抗原抗体複合体の化学量論決定[18, 19]や抗体と受容体の複合体結合様式の決定、などが多い。例えば、腫瘍壊死因子 TNF は炎症性疾患が発病する鍵となるメディエーターの 1 つであり、その治療薬としてアダリムマブやインフリキシマブやエタネルセプトといった抗体医薬品が使用されている。Native-MS を用いることで、今まで不明瞭だった TNF-抗体複合体の化学量論比が明らかになっている[20]。

先にも述べたがメチオニンの酸化は抗体のリサイクリングに関与する新生児型 Fc 受容体への結合能に影響を及ぼし、血中半減期を低下させる。ネイティブ質量分析を用いることで酸化された抗体と新生児型 Fc 受容体 FcRn との複合体の質量が測定でき、IgG1 抗体の Met265 の酸化が重鎖の両方にあるものは結合能が低下するが、片方だけのものは低下しないことが示されている[21]。

### 3.5 サイズ排除クロマトグラフィー-質量分析法 (SEC-MS)

SEC-MS はサンプルを SEC で分子の大きさごとに分離し、そののちに連結された質量分析で質量を測定する手法である。SEC は分子の溶液中での流体力学的サイズに基づいてサンプルを分離するため、溶出時間からは分子量の大小を決定できない。しかし、SEC に質量分析装置をオンラインで連結させることで分子量の測定が可能になる。

SEC-MS を用いて、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) より感度よく全長抗体の質量を測定した事例も報告されている。全長抗体のような分子量が大きく疎水性が比較的高いサンプルを RP-HPLC で分離する場合、カラムの温度を 65-70 度に上げるとピーク形状が向上することが知られているが[22]、解析中にサンプルが分解してしまう危険性がある。一方、ポリヒドロキシエチルアスパルトアミドが充填されたカラムを用いた SEC-MS による解析例では RP-HPLC-MS よりも高い感度の解析が達成されており、5 種類の全長抗体の質量を 25 ppm 以下の精度で同定している[23]。

### 3.6 キャピラリー電気泳動-質量分析法 (CE-MS)

CE-MS はキャピラリー電気泳動でサンプルを分離し、そののちに質量分析で質量を測定する手法である。多くの質量分析ではサンプルの分離を LC で行うが、CE-MS はその名の通り電気泳動によりサンプルを分離する。そのメリットとしては、LC よりも分離時間が短く、生体分子は拡散係数が小さいため高効率で分離でき、測定に必要なサンプル量も少ないことがあげられる[24]。しかし、電気泳動での分離に必要な SDS 等の溶液成分が MS での検出を妨害するためその応用はあまり進んでいなかった。

近年、CE-MS を用いた抗体の分析技術としてキャピラリー内に充填する前にカチオン化合物を混合しておくことで SDS による検出干渉を低くする報告がされている。還元処理により HC と LC に分離した抗体の検出において CTAB を加えることで、SDS の干渉がほぼないピーク強度で検出を行うことができるという報告がある[25]。

### 3.7 糖鎖解析

IgG クラス抗体では重鎖の 297 番目の Asn 残基に N-結合型の糖鎖が結合していることが知られているが、糖鎖構造の違いが抗体の ADCC 活性や CDC 活性さらには血中半減期を左右するので[26]、抗体医薬品においては開発の段階から製品化後の品質管理の段階まで適切に糖鎖の状態を解析できる必要がある。

糖鎖解析には糖鎖の構造や結合サイトを同定するために質量分析が用いられることが多い。PNGase 等の糖鎖切断酵素により遊離した糖鎖について質量分析を行うか、トリプシンなどのプロテアーゼ処理により断片化した糖鎖付加ペプチドについて質量分析を行い、データベースと照合することで組成と構造を決定する。CID において高エネルギーと低エネルギーを組み合わせ、さらにパラメータを最適化することで、全サブクラスの抗体に応用可能な測定手法が示されている[27]。ただし、糖鎖構造や結合部位の不均一性によりサンプル量が少なくなるため、糖鎖が付加していないペプチドに比べ、解析が難しい[28]。

### 3.8 水素重水素交換質量分析法 (HDX-MS)

水素重水素交換質量分析は図 3 に示すように、サンプルを重水素化したのちに酵素でペプチドに分解し、その質量増加を測定することでペプチドごとの重水素交換率を決定する手法である。

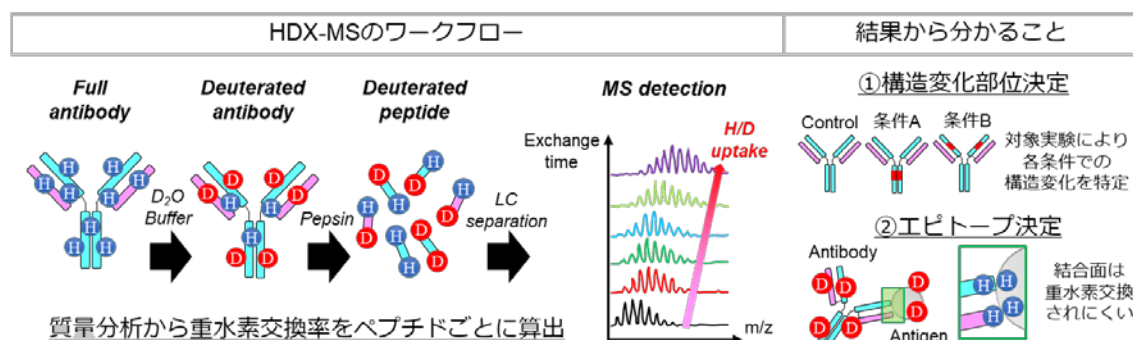


図 3. HDX-MS のワークフローおよび解析結果から分かること

重水素交換率は立体構造と構造の自由度に依存し、重水溶液に暴露されている部位で高く、内部に保護されている部位では低い。コントロールと対象サンプルの重水素交換率を比較することにより、サンプルの高次構造変化を議論する手法がしばしば用いられる。たとえば、サンプルとリガンドが結合している部位では重水素交換率が下がるため、抗原単独と抗体抗原複合体について比較を行うことにより結合サイト（エピトープ）を同定できる。前述のエピトープ決定以外の HDX-MS の抗体医薬品での利用として、バイオシミラーの構造同一性の確認や処方開発における添加剤の検討が増えつつある。以下、それぞれについて紹介する。

抗体医薬品の特許有効期間が切れるとその後発医薬品であるバイオシミラーの製造と販売が可能となるが、抗体は細胞を使って生産される複雑な構造を持つタンパク質であるため、オリジナルの抗体と一次構造が同一となるように cDNA を設計しても、生産されたバイオシミラーとオリジナルの抗体では高次構造や物性が異なる可能性がある。安全性・有効性の観点からもバイオシミラーがオリジナルの抗体と同等の高次構造を持つ必要があるが、高次構造の同等性の評価手法は限られている [29]。HDX-MS の場合、溶液中でのタンパク質の高次構造比較が可能で、実際にベバシズマブ等のバイオシミラーにおいて高次構造の同一性確認に利用されている[30]。

抗体医薬品の安定化において、添加物の果たす役割は大きい。現在の抗体医薬品においては平均 4.4 種類の添加剤が加えられており、凝集や変性、吸着の低減による品質の向上に寄与している [31]。添加剤の種類や濃度の最適化での HDX-MS の利用が試みられている。抗体の C<sub>H2</sub> ドメインに含まれるいくつかの領域は構造の自由度が高いほど抗体全体の熱安定性が低い傾向が強く、従って、その領域に含まれるペプチドの重水素交換率を指標とした処方条件のスクリーニングが提案されている[32]。

#### 4. 質量分析に必要なサンプル量

3 章の各節でとりあげた質量分析の抗体への応用例の論文をもとに、それぞれの測定に必要なサンプル量を以下の表 2 にまとめた。

表 2. 各質量分析手法の必要サンプル量

| 抗体への応用例                                           | サンプルおよび必要量, サンプルの状態                                                                                          | 質量分析機                                      |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 3.1 酸化部位の同定 (2016) [7]                            | IgG1 mAb<br>100 $\mu\text{g}^{(1)}$ , 消化前抗体                                                                  | LTQ/XL Orbitrap MS<br>(Thermo Fisher)      |
| S-S 結合位置の同定 (2018) [9]                            | IgG2 mAb<br>~30 $\mu\text{g}$ , トリプシン消化物                                                                     | Orbitrap Elite MS<br>(Thermo Fisher)       |
| 3.2 酸化箇所の同定 (2014) [10]                           | IgG1 mAb<br>1 $\mu\text{g}$ , 消化生成物                                                                          | LTQ Orbitrap Elite<br>FTMS (Thermo Fisher) |
| 3.3 Top-down approach による抗体の測定 (2018) [14]        | IgG1 mAb<br>0.5-1.0 $\mu\text{g}$ , 全長抗体                                                                     | Orbitrap Fusion Lumos<br>(Thermo Fisher)   |
| 3.4 複合体の質量および化学量論比の同定<br>抗体+OVA 複合体 (2006) [18]   | —                                                                                                            | —                                          |
| 抗体+NP-BSA 複合体 (2009) [19]                         | Anti-OVA mAbs (16 or 7 $\mu\text{M}$ ) +<br>OVA (1, 3, 6 excess mole)<br>2 $\mu\text{L}$ , 複合体               | Q-ToF 2<br>(Waters)                        |
| 抗体+TNF 複合体 (2017) [20]                            | Anti-NP mAb (10 $\mu\text{M}$ ) +NP-BSA<br>(1/3, 1, 3, 6 excess mole)<br>2 $\mu\text{L}$ , 複合体               | Q-ToF 2<br>(Waters)                        |
| Met 酸化抗体+FcRn 複合体 (2015) [21]                     | TNF antagonist mAb (2, 2.5, 3,<br>and 4 $\mu\text{M}$ ) + TNF (2 $\mu\text{M}$ )<br>~2-5 $\mu\text{L}$ , 複合体 | SYNAPT G2-Si HDMS<br>(Waters)              |
| 3.5 全長抗体の質量の同定 (2008) [23]                        | IgG1 mAb, huFcRn<br>表 記 な し (Each 8 $\mu\text{M}$ ,<br>mAb/huFcRn = 1:3 complex)                             | Q-TOF Ultima MS<br>(Waters)                |
| 3.6 HC、LC の質量の同定 (2016) [25]                      | mAb<br>4 $\mu\text{g}$ , 非還元および還元抗体                                                                          | Agilent TOF MS<br>(Agilent)                |
| 3.7 全サブクラスの抗体で測定可能な CID<br>フラグメンテーション (2016) [27] | IgG1 mAb<br>125 $\mu\text{g}^{(1)}$ , 還元前 SDS- 抗体<br>complex                                                 | micrOTOF-Q MS<br>(Bruker Daltonics)        |
| 3.8 バイオシミラーの構造比較 (2016) [30]                      | IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgM<br>1 $\mu\text{L}^{(2)}$ , トリプシン消化物                                           | maXis HD Q-TOF MS<br>(Bruker Daltonics)    |
| 添加剤の処方検討 (2018) [32]                              | IgG1 mAb<br>30 $\mu\text{g}$ , 重水素化後ペプシン消<br>化物                                                              | LTQ-Orbitrap Velos MS<br>(Thermo Fisher)   |
|                                                   | IgG4 mAb<br>62.5 $\mu\text{g}$ , 重水素化後ペプシン<br>消化物                                                            | QTOF MS<br>(Agilent)                       |

(1)サンプル必要量が 1 インジェクト分であるかが明記されていないもの

(2)タンパク量として 5  $\mu\text{g}$  の抗体があれば SDS-PAGE 後の in-gel digestion 試料で分析可能である  
略記

mAb: Monoclonal antibody, モノクローナル抗体

huFcRn: Human neonatal Fc receptor, ヒト新生児型 Fc 受容体

どの手法においても必要サンプル量はマイクログラムオーダーであり、少ないサンプル量で質量分析を利用した解析が可能であることが分かる。ただし表に記載している必要量はあくまで一例であり、同じ抗体でも装置構成や作業手順が異なれば同量で解析できるわけではない点に注意が必要である。サンプルごとに測定手法や質量分析のパラメータの最適化を行うことで、良好なデータ取得が可能となる。



## 謝辞

今回執筆の機会を与えていただきました日本薬学会構造活性相関部会の関係者の方々に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部、日米欧で承認された抗体医薬品 (2018)  
<http://www.nihs.go.jp/dbcb/TEXT/Mab-T1-180707.pdf>
- [2] 独立行政法人医薬品医療機器総合機構、「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス」(2012)  
<http://www.pmda.go.jp/files/000206143.pdf>
- [3] Amano M, Hasegawa J, Kobayashi N, Kishi N, Nakazawa T, Uchiyama S, Fukui K. Specific racemization of heavy-chain cysteine-220 in the hinge region of immunoglobulin gamma 1 as a possible cause of degradation during storage, *Anal Chem*, **83**, 3857-3864 (2011)
- [4] Amano M, Kobayashi N, Yabuta M, Uchiyama S, Fukui K. Detection of histidine oxidation in a monoclonal immunoglobulin gamma (IgG) 1 antibody, *Anal Chem*, **86**, 7536-7543 (2014)
- [5] Kuo TT, Aveson VG. Neonatal Fc receptor and IgG-based therapeutics, *MAbs*, **3**, 422-430 (2011).
- [6] Liu D, Ren D, Huang H, Dankberg J, Rosenfeld R, Li L, Brems DN, Remmele Jr RN. Structure and stability changes of human IgG1 Fc as a consequence of methionine oxidation, *Biochemistry*, **47**, 5088-5100(2008)
- [7] Amano M, Fukui K, Uchiyama S. Suppression of methionine oxidation of a pharmaceutical antibody stored in a polymer-based syringe, *J Pharm Sci*, **105**, 623-629 (2016)
- [8] McAuley A, Jacob J, Kolvenbach CG, Westland K, Lee HJ, Brych SR, Rehder D, Kleemann GR, Brems DN, Matsumura M. Contributions of a disulfide bond to the structure, stability, and dimerization of human IgG1 antibody C<sub>H</sub>3 domain, *Protein Sci*, **17**, 95-106 (2008)
- [9] Guan X, Zhang L, Wypych J. Direct mass spectrometric characterization of disulfide linkages, *MAbs*, **10**, 572-582 (2018)
- [10] Fornelli L, Ayoub D, Aizikov K, Beck A, Tsybin YO. Middle-down analysis of monoclonal antibodies with electron transfer dissociation orbitrap fourier transform mass spectrometry, *Anal Chem*, **86**, 3005-3012 (2014)
- [11] Torisu T, Maruno T, Hamaji Y, Ohkubo T, Uchiyama S. Synergistic effect of cavitation and agitation on protein aggregation, *J Pharm Sci*, **106**, 521-529 (2017)
- [12] Chevreux G, Tilly N, Bihoreau N. Fast analysis of recombinant monoclonal antibodies using IdeS proteolytic digestion and electrospray mass spectrometry, *Anal Biochem*, **415**, 212-214 (2011)
- [13] Toby TK, Fornelli L, Kelleher NL. Progress in top-down proteomics and the analysis of proteoforms, *Annu Rev Anal Chem*, **9**, 499-519 (2016)
- [14] Fornelli L, Srzentić K, Huguet R, Mullen C, Sharma S, Zabrouskov V, Fellers RT, Durbin KR, Compton PD, Kelleher NL. Accurate Sequence Analysis of a Monoclonal Antibody by Top-Down and Middle-Down Orbitrap Mass Spectrometry Applying Multiple Ion Activation Techniques, *Anal Chem*, **90**, 8421-8429 (2018)
- [15] Hernandez H & Robinson CV. Determining the stoichiometry and interactions of macromolecular assemblies from mass spectrometry, *Nat Protoc*, **2**, 715-726 (2007)
- [16] Ishii K, Zhou M, Uchiyama S. Native mass spectrometry for understanding dynamic protein complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 275-286 (2018)
- [17] 内山進, 野田勝紀, 石井健太郎 質量分析による蛋白質の高次構造解析, *生物物理*, **55**, 270-273 (2015)
- [18] Oda M, Uchiyama S, Robinson CV, Fukui K, Kobayashi Y, Azuma T Regional and segmental flexibility of antibodies in interaction with antigens of different size, *FEBS J.*, **273**, 1476-1487 (2006)
- [19] Oda M, Uchiyama S, Noda M, Nishi Y, Koga M, Mayanagi K, Robinson CV, Fukui K, Kobayashi Y, Morikawa K, Azuma T Effects of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes, *Mol. Immunol.*, **47**, 357-364 (2009)
- [20] Krayukhina E, Noda M, Ishii K, Maruno T, Wakabayashi H, Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A, Kato M, Uchiyama S. Analytical ultracentrifugation with fluorescence detection system reveals differences in complex formation between recombinant human TNF and different biological TNF antagonists in various environments, *MAbs*, **9**, 664-679 (2017)

- [21] Habberger M, Heidenreich AK, Schlothauer T, Hook M, Gassner J, Bomans K, Yegres M, Zwick A, Zimmermann B, Wegele H, Bonnington L, Reusch D, Bulau P. Functional assessment of antibody oxidation by native mass spectrometry, *MAbs*, **7**, 891-900 (2015)
- [22] Dillon TM, Bondarenko PV, Speed Ricci M. Development of an analytical reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for characterization of recombinant antibodies, *J Chromatogr A*, **1053**, 299-305 (2004)
- [23] Brady LJ, Valliere-Douglass J, Martinez T, Balland A. Molecular mass analysis of antibodies by on-line SEC-MS, *J Am Soc Mass Spectrom*, **19**, 502-509 (2008)
- [24] Creamer JS, Oborny NJ, Lunte SM. Recent advances in the analysis of therapeutic proteins by capillary and microchip electrophoresis, *Anal Methods*, **6**, 5427-5449 (2014)
- [25] Sánchez-Hernández L, Montealegre C, Kiessig S, Moritz B, Neusüß C. In-capillary approach to eliminate SDS interferences in antibody analysis by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry, *Electrophoresis*, **38**, 1044-1052 (2017)
- [26] Eon-Duval A, Broly H, Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach, *Biotechnol Prog*, **28**, 608-622 (2012)
- [27] Hinneburg H, Stavenhagen K, Schweiger-Hufnagel U, Pengelley S, Jabs W, Seeberger PH, Silva DV, Wührer M, Kolarich D. The Art of destruction: optimizing collision energies in quadrupole-time of flight (Q-TOF) instruments for glycopeptide-based glycoproteomics, *J Am Soc Mass Spectrom*, **27**, 507-519 (2016)
- [28] Stavenhagen K, Hinneburg H, Thaysen-Andersen M, Hartmann L, Varón Silva D, Fuchser J, Kaspar S, Rapp E, Seeberger PH, Kolarich D. Quantitative mapping of glycoprotein micro-heterogeneity and macro-heterogeneity: an evaluation of mass spectrometry signal strengths using synthetic peptides and glycopeptides, *J Mass Spectrom*, **48**, 627-639 (2013)
- [29] Weise M, Bielsky MC, De Smet K, Ehmann F, Ekman N, Narayanan G, Heim HK, Heinonen E, Ho K, Thorpe R, Vleminckx C, Wadhwa M, Schneider CK. Biosimilars-why terminology matters, *Nat Biotechnol*, **29**, 690-693 (2011)
- [30] Pan J, Zhang S, Borchers CH. Comparative higher-order structure analysis of antibody biosimilars using combined bottom-up and top-down hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry, *Biochim Biophys Acta*, **1864**, 1801-1808 (2016)
- [31] 医薬産業政策研究所、政策研ニュース No.50 (2017) <http://www.jpma.or.jp/opir/news/news-50.pdf>
- [32] Toth RT 4th, Pace SE, Mills BJ, Joshi SB, Esfandiary R, Middaugh CR, Weis DD, Volkin DB. Evaluation of hydrogen exchange mass spectrometry as a stability-indicating method for formulation excipient screening for an IgG4 monoclonal antibody, *J Pharm Sci*, **107**, 1009-1019 (2018)

## ///// Activities /////

## 構造活性フォーラム 2018 開催報告

実行委員長 岡島 伸之

株式会社 CAC クロア

構造活性フォーラム 2018 は 2018 年 6 月 15 日 (金)、メルパルク京都 (京都市) にて、「創薬におけるビッグデータの活用と AI 戦略」と題して開催しました。

最近、毎日のように話題に上り報道される、「ビッグデータ活用や AI 技術」が、医薬品開発や創薬現場でどの程度、浸透し進展しているかについては、少なからず杞憂を抱いております。そこで、今回のフォーラムでは、この業界において多くの研究者が潜在する課題を認識しつつ、今後、多様な場面でビッグデータの活用を図っていくことを願って企画しました。

プログラムは以下のとおりです。

講演 1 「AI 創薬：薬効や副作用を予測するデータ駆動型アプローチ」

山西 芳裕 (九州大学・生体防御医学研究所)

講演 2 「クラウドと仮想環境を活用した AI 創薬解析基盤について」

久保 竜一 (株式会社 DeNA)

講演 3 「人工知能が加速する医薬・化学品の安全性評価」

植沢 芳広 (明治薬科大学・医療分子解析学研究室)

講演 4 「製薬企業におけるビッグデータ活用ー構造毒性相関への適用事例ー」

小林 好真 (第一三共株式会社・安全性研究所)

講演 5 「構造活性相関情報を効率的に選択する能動学習の医薬品開発応用への最新結果と課題」

J. B. Brown (京都大学・医学研究科・分子バイオサイエンス研究室)

山西先生からは化合物に関する化学構造・表現型・遺伝子発現・標的分子情報、疾患に関する病因遺伝子・異常パスウェイ・環境因子・臨床情報などの医薬ビッグデータを融合解析し、医薬品候補化合物の薬効や副作用を予測する機械学習の手法についてご紹介いただきました。既存薬の新しい適応可能疾患を同定するドラッグリポジショニングや化合物の毒性予測への応用例など先端的なご研究の一端もご披露下さいました。

久保先生からは、IT 企業のエンジニアやケモインフォマティシャンが汎用する IT 技術、とりわけコンテナ技術のデファクトスタンダードである Docker とクラウドプラットフォームの AWS についてご紹介いただきました。コンテナはホストマシンのカーネルを利用し、プロセスやユーザなどを隔離することで、あたかも別のマシンが動いているかのように動かすことができることや、軽量で高速に起動、停止などが可能となる特徴がわかりやすく説明されました。

植沢先生からは、毒性予測コンペティション Tox21 data challenge 2014 に参加されて好成績を収めた QSTR 予測モデル構築についての話題を中心にご紹介いただきました。また、医薬品毒性予測戦略の策定、ディープラーニングに対する構造情報入力法の開発についても興味あるご意見を伺いました。

小林先生からは、製薬会社における開発化合物について、off-target 実測結果と、ChEMBL、PubChem に代表される化合物構造と薬理活性のビッグデータを用いた off-target 推測結果とを比較し、in silico off-target 推測の精度を検証するという先進的な研究をご紹介いただきました。さらに、創薬過程における構造活性相関研究における、in silico off-target 推測手法についてもご意見を伺いました。

J. B. Brown 先生は、低分子の活性予測計算モデルは、より大きなデータセットに基づくモデル作製がトレンドとなっているが、ケモゲノミクスの能動的学習のような最近の研究では、効果的なモデルに必要なのはデータのほんの一部であることを指摘されました。さらに、こうした small data を動的に選択して、化合物と受容体の相互作用パターンを抽出するモデル構築法を紹介し、その実例についてご説明をいただきました。

そして、講師 5 名をパネリストとして、「創薬におけるビッグデータの活用と AI 戦略」を主題に、会場も含め活発なパネルディスカッションが行われました。

本フォーラムが、企業やアカデミアの研究者にとって、創薬にどのようにビッグデータを活用すべきかについて、新たな発想の端緒となることを願って開催しましたが、その目的はある程度達成されたのではないかと思います。

本フォーラムは、本当に多くの方々の貢献によって、充実したものとなったと感じております。ご講演いただきました先生方、座長を務めていただいた先生方、活発な議論を行っていただいた参加者の方々に感謝いたします。また、企業の社員という制約がある実行委員長のもとで実行委員を引き受け、多くの実務を担当していただき、フォーラムを大成功に導いてくださった実行委員の中川好秋先生（京都大学）、赤松美紀先生（京都大学）、宮下正弘先生（京都大学）、服部一成先生（塩野義製薬株式会社）のご助力、ご支援に深く感謝いたします。また、お忙しい中ホームページを作成していただいた高木達也先生ならびに、ご支援をいただいた仲西功先生、本間光貴先生、粕谷敦先生、大田雅照先生をはじめとする構造活性相関部会常任幹事の先生方に感謝いたします。また、開催運営のご援助をいただきました日本薬学会、広告掲載によりご援助いただきました企業、協賛いただきました企業・学会に感謝いたします。

来年の構造活性フォーラム 2019 は、東京大学の津本先生に実行委員長をお引き受けいただきました。「創薬モダリティを考える」といった大変興味深い観点でのフォーラムを企画されていると伺っております。時期としては来年の 6 月頃、場所は日本薬学会長井記念館の長井記念ホールを予定されています。ぜひ多くの皆様が来年のフォーラムにご参加いただき、この興味深い主題について活発に議論されるようお願い申し上げます。

//// Activities ////

---

第 11 回薬物の分子設計と開発に関する日中合同シンポジウム 開催報告

実行委員長 赤松 美紀

京都大学大学院 農学研究科

第 11 回薬物の分子設計と開発に関する日中合同シンポジウムが 6 月 22-25 日、中華人民共和国紹興市で開催された。「紹興酒」でおなじみの紹興市は、2500 年の歴史を有する風光明媚な古都で、文学者、魯迅の故郷でもある。中国側の実行委員長は Zhejiang University の Prof. Yongzhou Hu であった。日本からは総勢 17 名の参加で、中国側からは数 10 名が参加されていた。招待講演、一般講演数などは以下の通りである。

Opening Remarks

Prof. Zongru Guo (China), Prof. Hiroshi Terada (Japan)

Invited Lectures 6 題

Prof. Masaji Ishiguro (Japan)

Prof. Qidong You (China)

Prof. Dali Yin (China)

Prof. Feng Zhu (China)

Prof. Yoshimasa Takahashi (Japan)

Prof. Ke Ding (China)

一般講演

Oral 18 題

Poster 25 題

日本の参加者の講演は、ドラッグデザインの手法開発を含む基礎研究の内容が多かったのに対し、中国の参加者の講演は医薬開発に関する講演が多かったのが対照的であった。臨床にまで進んでいる医薬候補化合物の話も行われた。中国の薬学系大学では基礎研究より応用重視で、実際に医薬開発を行うことが求められているのだと強く感じた。今回、日本側の企業からの参加はソフトウェア関係の 2 社から各 1 名であったが、中国の先生より、日本の医薬企業からもシンポジウムに参加してほしいという要請があった。次回までに検討を行いたいと考えている。シンポジウム開催にあたり、アジア医薬化学連合から協賛、支援をいただき、若手の旅費補助に使用させていただいた。ここに感謝したい。

次回は 2 年後の 2020 年、中国側は China Pharmaceutical University の Prof. Qidong You を実行委員長、日本側は大阪大学の高木達也教授を実行委員長、田 雨時助教を実行委員として、中華人民共和国南京市で行われる予定である。

//// Activities ////

---

<会告>

**第 46 回構造活性関連シンポジウム**

**主催** 日本薬学会構造活性関連部会

**会期** 2018 年 12 月 5 日（水）～ 2018 年 12 月 6 日（木）

**会場** 大阪大学銀杏会館

**日程** 12 月 5 日（水）特別講演、ポスター発表、懇親会  
12 月 6 日（木）招待講演、一般講演

**特別講演**

「グレブナー基底と医薬統計」

日比 孝之（大阪大学大学院 情報科学研究科）

**招待講演**

「フラグメント分子軌道法に基づく創薬基盤の構築」

福澤 薫（星薬科大学）

「構造活性関連の自動探索：自動設計と自動合成が融合するロボット創薬の幕開け」

石原 司（産業技術総合研究所）

**一般講演を含む全講演のプログラム**

<http://www.qsarj.org/46sympo/Program2.pdf>

**参加申込** 締切日：11 月 15 日（木） 当日の申し込みはお受けできませんのでご注意ください。  
参加登録費：[一般]8,000 円、[学生]2,000 円  
参加登録：ホームページよりお願いいたします。

**ホームページ** <http://www.qsarj.org/46sympo/index.html>

**懇親会** 会場：銀杏会館内レストラン ミネルヴァ  
時間：17:30～19:30  
参加費：[一般]7,000 円、[学生]3,000 円

**問い合わせ先** 第 46 回構造活性関連シンポジウム実行委員会  
e-mail: sar2018@qsarj.org（@を半角に変更願います）



---

**部会役員人事**

|                |           |                   |
|----------------|-----------|-------------------|
| 平成 30 /2018 年度 | 常任世話人     | 2018/10/1 現在      |
| 部会長            | 中川好秋      | (京都大院農学研究科)       |
| 副部会長           | 服部一成      | (塩野義製薬株式会社)       |
| 副部会長           | 本間光貴      | (理化学研究所)          |
| 会計幹事           | 前田美紀      | (農業・食品産業技術総合研究機構) |
| 庶務幹事           | 竹田-志鷹 真由子 | (北里大学薬学部)         |
| 広報幹事           | 広野修一      | (北里大学薬学部)         |
| SAR News 編集長   | 田上宇乃      | (味の素株式会社)         |
| ホームページ委員長      | 高木達也      | (大阪大院薬学研究科)       |

---

**構造活性相関部会の沿革と趣旨**

1970年代の前半、医農薬を含む生理活性物質の活性発現の分子機構、立体構造・電子構造の計算や活性データ処理に対するコンピュータの活用など、関連分野のめざましい発展にともなって、構造活性相関と分子設計に対する新しい方法論が世界的に台頭してきた。このような情勢に呼応するとともに、研究者の交流と情報交換、研究発表と方法論の普及の場を提供することを目的に設立されたのが本部会の前身の構造活性相関懇話会である。1975年5月京都において第1回の「懇話会」(シンポジウム)が旗揚げされ、1980年からは年1回の「構造活性相関シンポジウム」が関係諸学会の共催の下で定期的開催されるようになった。

1993年より同シンポジウムは日本薬学会医薬化学部会の主催の下、関係学会の共催を得て行なわれることとなった。構造活性相関懇話会は1995年にその名称を同研究会に改め、シンポジウム開催の実務担当グループとしての役割を果たすこととなった。2002年4月からは、日本薬学会の傘下組織の構造活性相関部会として再出発し、関連諸学会と密接な連携を保ちつつ、生理活性物質の構造活性相関に関する学術・研究の振興と推進に向けて活動している。現在それぞれ年1回のシンポジウムとフォーラムを開催するとともに、部会誌のSAR Newsを年2回発行し、関係領域の最新の情勢に関する啓蒙と広報活動を行っている。

本部会の沿革と趣旨および最新の動向などの詳細に関してはホームページを参照頂きたい。

([http://bukai.pharm.or.jp/bukai\\_kozo/index.html](http://bukai.pharm.or.jp/bukai_kozo/index.html))

---

**編集後記**

日本薬学会構造活性相関部会誌 SAR News 第 35 号をお届けいたします。今号では、バイオ医薬品の機器分析活用法をテーマに、NMR と質量分析のご専門の先生方にご寄稿をお願いいたしました。

Perspective/Retrospective では、自然科学研究機構生命創成探究センターの加藤先生、谷中先生に抗体の NMR 解析について歴史から現在の最新状況まで俯瞰してご執筆いただきました。Cutting Edge では、大阪大学の内山先生に抗体の医薬品開発および品質管理において有用な質量分析の活用事例をご紹介いただきました。どちらも最新の教科書となりうる内容であり、多くの皆様にお読みいただきたく存じます。ご多忙の中、快くご執筆していただいた先生方に深く感謝申し上げます。

夏のフォーラムの開催報告、日中合同シンポジウムの開催報告、秋のシンポジウムの会告も掲載いたしましたので、ご参考になれば幸いです。(編集委員会)

SAR News No.35 平成 30 年 10 月 1 日

発行:日本薬学会 構造活性相関部会長 中川 好秋

SAR News 編集委員会

(委員長) 田上 宇乃、飯島 洋、河合健太郎、合田浩明、清田 泰臣、幸 瞳

\*本誌の全ての記事、図表等の無断複写・転載を禁じます。