

199800448A

平成10年度厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
総括研究報告書

人工抗体ライブラリーの作成とその利用法の開発に関する研究

主任研究者 黒澤良和

藤田保健衛生大学総合医科学研究所・免疫学研究部門教授

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）
総括研究報告書

人工抗体ライブラリーの作成とその利用法の開発に関する研究

主任研究者 黒澤良和 藤田保健衛生大学総合医科学研究所・免疫学研究部門教授

研究要旨

本研究は「臨床に役立つ様々なヒト抗体を作製すること」を目標に進められている。本研究課題は主任研究者の研究室に於て数年前に開始され、抗原結合部に相当するCDR配列を多様化したライブラリーを作製することを行ってきた。平成9年8月に厚生研究事業に採択されたことに伴い、それまでの方針を大きく切り換えて全てヒト型遺伝子を用いることにした。ヒトの有する抗体レパートリーを完全に覆い、それを越える巨大なレパートリーからなる抗体ライブラリーを作製することを目標にした。抗体はL鎖とH鎖のVドメインで抗体結合部を形成するが、L鎖V領域のアミノ酸配列の多様性は相対的に低い。ヒトの場合、胎児型V λ 遺伝子、V κ 遺伝子の総数は各々36個、37個であり、又J λ 、J κ 遺伝子数は、各々7個、4個である。VL-JL結合ができるときに同じVL、JL遺伝子の組み合わせでもその結合点がズレることにより異なる配列を作り出すことが知られているが、発現されるVL-JL遺伝子の総数は多く見積もっても数100種類と考えられる。L鎖とは対称的にH鎖のV領域の多様性は極端に高い。CDR3がその典型で、V-D-J結合ができる時にV-D、D-Jの結合部でその末端の部分的切除とランダム配列の挿入が起るために、出来上がったCDR3の配列は事実上抗体産生細胞毎に異なる。このような状況を考慮して、抗体ライブラリーを作製することにした。抗体ライブラリーは世界的に数カ所で既に作製されているが、それらの抗体ライブラリーが従来の細胞融合によるモノクローン抗体作製技術を凌駕する状況になっていない理由は、大腸菌中での抗体遺伝子の発現－抗体のVドメインのfolding-VH,VLドメインの会合、その全ての過程が正しく起り抗原結合部を形成しているクローンの率がライブラリーの中で必ずしも高くないこと、又、作製されたライブラリーの中でV遺伝子に片寄りがあること等が考えられる。そこで我々は、これらの問題を克服した理想的なヒト抗体ライブラリー作製を目指すことにした。抗体はM13ファージ膜上のcp3タンパクと融合してFabの形で発現させる。L鎖としては数百個単離して全てその配列を決定し、大腸菌での発現－folding－VHドメインとの会合が起ることを確認した上で、全てのL鎖レパートリーをおおむね200個を選別した。H鎖については扁桃、臍帯血等Bリンパ球に富む数10名分のヒト手術除去材料よりリンパ球画分を分離した後、mRNAを調製し用いた。7組のVH遺伝子ファミリーについて各々プライマーを設定し、RT-PCR法でVH-D-JH領域を増幅した。各々多数のクローンをsequenceして片寄りなく増幅されていることを確認した。増幅されていない遺伝子については新たにプライマーを設計し直してRT-PCRを行った。最終的に10⁹個を超える独立したクローンからなるVH遺伝子ライブラリーを作製した。このL鎖H鎖をcombinatorialに組み合わせて総数約1,000億（10¹¹）種類の独立したクローンからなる抗体ライブラリーの作製を完了した。このライブラリーに含まれるクローンは70%以上がFab型抗体をファージ膜上に発現している。このライブラリーは常に10¹¹種の多様性を保った状態で取り扱う必要がある。そこで100Lの大量培養を行って2Lずつに分けてストックし、その一部を更に100L培養して2Lずつ分け、各々を1回のスクリーニング用のprecultureとして用いることにした。1回のスクリーニングに2x10¹³個のファージ粒子を用いて実施している。今まで20数種の抗原に対して抗体単離を行ったが、その結果は次のように要約される。

(1)タンパク抗原の場合、そのタンパク質を50ng～200mg/mlの濃度でチューブに付着させる。殆どのタンパク質はimmunotubeに付着するが、一部付着しないものがあるので、それらについては今後検討が必要である。(2)抗原がチューブに付着する場合は数回panningを行った後に必ず多種のモノクローン抗体を含むファージ抗体が単離された。1回のpanning-回収されたファージの増殖は2日の行程なので約10日間で1個の抗原に対するファージが回収される。(3)モノクローン化した後各々のクローンの結合活性をELISA法で解析すると様々な結合力を示すクローンが存在した。一部結合活性を示さないものが含まれるが、その多く

はDNA上でdeletionを起こしており、その増殖速度が速いために混在してくるものと判断した。4)単離された抗体の抗原結合力は $10^6 \sim 5 \times 10^7 M^{-1}$ に分布するものが多数を占めた。以上の結果に基づき作製した抗体ライブラリーは様々なエピトープに対応した抗体を必ず含むという点に於て優れた性能を有していると考えている。一方で抗原結合力が $10^8 M^{-1}$ 以上であることが望ましいという点で、単離した抗体のV領域に更に変異を導入して、結合活性の高いクローンのみを選別する必要があるので、現在error-prone PCR法を用いる条件を検討している。

A. 研究目的

従来の細胞融合を用いたモノクローン抗体作製法では抗原による動物の免疫、細胞融合、目的とする抗体産生細胞のクローン化という段階を得て抗体が単離される。そこで精製した抗原を大量に有していること、その物質が免疫される動物にとって免疫原性を示すことが必要であり、全行程に長期間を必要とし多くの労力を要する。又ヒトではこの技術を応用できない。最近になってヒト抗体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスが作製されたが、本研究はファージディスプレイ系を用いてヒト抗体ライブラリーを作製し、それを用いて臨床に役立つ様々なヒト抗体を単離し、完全なヒト型抗体として作製して大量に調製することを目標に研究している。標的としては抗ウイルス中和抗体、抗腫瘍特異抗体、抗毒素中和抗体を計画している。更に今までマウスモノクローン抗体として単離された後マウス-ヒトキメラ抗体、及びCDR部分のみをマウス由来としてそれ以外をヒト由来とするヒト化抗体とする標的となっていた各種抗原についても直接ヒト抗体として単離することを製薬会社と協力して実施する予定である。この目的達成のために(1)どのようなエピトープに対しても特異的に結合する抗体が必ず含まれる完璧な抗体ライブラリーを作製すること、(2)ファージ抗体ライブラリーのスクリーニング法を確立すること、(3)使用目的に合致した充分高い抗原結合力を示すクローンの作製と単離法を確立すること、(4)ファージ抗体として単離される抗体遺伝子を完全なヒト型遺伝子に形を換えて発現させるために必要なベクターを構築すること、(5)ヒト抗体の大量生産及びその精製法を確立することを計画し、実施している。更に抗ウイルス中和抗体を得るためにはウイルス粒子の感染力を測定できる系、抗腫瘍特異抗体については、細胞殺傷力のある標的としての抗原をどのように同定するか等の検討が必要となる。

B. 研究方法

1. 抗体VL遺伝子の調製

Bリンパ球に富むヒト手術除去材料よりmRNAを調製した。ヒトの抗体 V_{κ} 、 V_{λ} 、 J_{κ} 、 J_{λ} 遺伝子については既にその全一次構造が判明している。更に V_{κ} 、 V_{λ} 遺伝子はアミノ酸配列の類似性の高さに従って各々5個、6個のファミリーに分類されている。そこでファミリー毎にプライマーを設定し、 C_{κ} 、 C_{λ} 遺伝子の3'末端に相補的なプライマーと組み合わせてRT-PCRを行った。 $V_{\kappa}J_{\kappa}C_{\kappa}$ 、 $V_{\lambda}J_{\lambda}C_{\lambda}$ を含むDNA断片を各々クローン化し、数多くの塩基配列を決定した。その中でin-frameであること、大腸菌で発現されること、foldingすること、VHドメインと会合することを基準にしてクローンを選別した。

2. 抗体VH遺伝子ファミリーの作製

Bリンパ球に富むヒト手術除去組織、具体的には数10名分に相当する扁桃、臍帯血、骨髓、末梢血よりmRNAを調製した。VH遺伝子は7ファミリーに分かれており、各々のファミリー毎にプライマーを設定し合成した。JH遺伝子は共通配列に相補的な配列のプライマーを合成した。RT-PCRによりVH-D-JH遺伝子を増幅してファミリー毎に数10のクローンを単離してその配列を決定した。一部増幅されていない遺伝子があったので、別途プライマーを設定し、全てのVH-D-JH遺伝子が片寄りなく増幅されることを確認した。

3. 抗体遺伝子ライブラリーの作製

上記1のVL-JL遺伝子と2のVH-D-JH遺伝子ライブラリーをcombinatorialに組み合わせて巨大な抗体ライブラリーを作製した。

4. 抗体ライブラリーの性質の検討

作製したライブラリーの中でどの程度のクローンがFab構造をした抗体を運現しているのかを検討した。方法はランダムに100個のクローンを単離して抗 C_{κ} 抗体、抗 C_{λ} 抗体、抗Fd抗体を用いて検討した。

5. 抗体ライブラリーのスクリーニング法

抗体ライブラリーはpanning法でスクリーニングした。50ng~200 μ g/mlの精製抗原をimmunotubeに付着させる。その後 10^{13} 程度のファージ粒子を含むファージ抗体ライブラリーを加え、一定時間保温する。数回~20回洗浄した後、チューブに付着したファージ粒子を回収し、大腸菌に感染して増殖させる。この過程を数回繰り返した後、回収されるファージ数が高まった状態でそれをポリクローン抗体画分とした。それを大腸菌に感染させて、個別の大腸菌に分離したものをモノクローン抗体とした。

6. ELISA法

分離したポリクローン抗体及びモノクローン抗体をファージ粒子としてヘルパーファージなしに大腸菌に感染し、長時間培養するとcpIIIに融合したFab抗体が分泌されてくる。この抗体を用いて各種抗原に対してELISA法で抗原結合力を測定した。

C 研究結果

1. ファージ抗体ライブラリーの作製

性質の異なる3種の抗体ライブラリーを作製した。扁桃や末梢血はIgG型の抗体を多く含むと考えられ、臍帯血や骨髄はIgM型抗体が多いと予想される。そこで一つは逆転写でmRNAをcDNAに変える段階をランダムプライマーで行い、IgMに富むものについては μ 遺伝子に相補的な配列を含むプライマーを用いた。L鎖については2種のライブラリーは200個の選別したVL-JLクローンをセットとして用い、1組みのライブラリーはL鎖についても巨大ライブラリー化した。作製された3組のライブラリーは用いた抗原についてどれからも多数の抗体が得られることが判明したので、全て混合して用いることにした。作製した抗体ライブラリーには 10^{11} 個の独立したクローンが含まれている。 10^{11} 個の独立性を保つために100L培養して2Lずつに小分けした。更にその2Lを100L培養し、2Lに小分けした。各2Lを大量に培養して50x50=2,500回分を調製した。このライブラリーに含まれるクローンは70%以上の率で正しくFab抗体が発現していることが確認された。又VHファミリーとVLファミリーの組み合わせでも、片寄りなくFab構造がつけられることが示された。そこで作製したライブラリーは数10名のヒトが形造る抗体レパートリーを忠実に反映したものであると判断した。

2. 抗体ライブラリーのスクリーニング結果

最初利用可能な20種を越える様々な抗原(チトクロームC、BSA、ニワトリ卵白リゾチーム、各種ヒストン、各種ステロイド、線虫由来の多くのタンパク質、チトシン水酸化酵素、アビジン、GST等)を用いて抗体が単離できるかを検討した。抗原がimmunotubeに付着する限り平均5回のpanningで抗原に結合するファージ抗体が濃縮されることが判明した。モノクローン抗体化した後、ELISAで抗原結合力を測定すると20~30%のクローンが抗原結合力を示さないものが含まれるが、それらはDNA上で部分的欠失(deletion)を起こしたものであり、非特異的に吸着したファージの中で生育速度が速いために最後まで混入してきたものと思われた。結合活性を示すものについて数多く塩基配列を決定したが、抗原毎に数10種類のモノクローン抗体を含むポリクローン抗体が濃縮されていることが示された。但し得られるポリクローン抗体の中ではその存在比には大きな片寄りがあった。

3. 得られた抗体の性能

単離されたモノクローン抗体の中で数クローンについてBIAcoreを用いて正確に抗原結合力を測定した。様々な結合力を示すクローンが含まれるが、その多くは 10^6 ~ $5 \times 10^7 M^{-1}$ に分布した。得られたポリクローン抗体及びモノクローン抗体の研究試薬としての性能をWestern blottingにより検出した。ポリクローン抗体でもモノクローン抗体でもFab-cp3融合タンパクが優れた性能を示すことが判明した。精製抗原についてWestern blottingでの検出限界は0.1~1ngであった。更に数多くのタンパクの混合物に対するWestern blottingの結果は標的抗原のみがsingle bandとして同定され、cross reactiveなbandは存在しなかった。この例の中に通常のラットを精製抗原により免疫した抗血清では検出できないものも含まれており、作製したライブラリーの中に含まれる抗体は、動物個体から得られるものより優れた性能を有するものが含まれることが判明した。

D 考察

本研究課題は「臨床に役立つヒト抗体作製」を目標に研究が進められている。この目標達成のために研究を二段階に分けて設定した。第一段階は、どのような標的抗原に対してもそれをスクリーニングするだけで抗体を単離できる理想的なヒト型抗体ライブラリーの作製であり、第二段階で具体的に抗ウイルス中和抗体、抗腫瘍特異抗

体、抗毒素中和抗体を単離することとした。平成9-10年度の研究で第一段階の目標はほぼ満足できる形で達成したと判断している。その具体的根拠は、(1)1,000億の独立したクローンからなるヒト型ファージ抗体ライブラリーを作製し、その中では70%以上がFab型抗体をファージ膜上に発現している。(2)このライブラリーは、ランダムに選んだ数多くのクローンの塩基配列の結果から殆ど全てのヒトVL-JL、VH-D-JH遺伝子を含んでいる。(3)20種を越える抗原について抗体ライブラリーをスクリーニングした結果、各々の抗原に特異的に結合する抗体が、数10種含まれるポリクローン抗体が濃縮された。(4)モノクローン抗体化してその抗原結合力を測定すると $10^6 \sim 5 \times 10^7 M^{-1}$ に分布するものが多かった。(5)単離されたポリクローン抗体及びモノクローン抗体をWestern blotting用の試薬として用いると、back groundなしにsharpなバンドが検出された。その検出限界は0.1~1 ngであった。以上の結果は、得られた抗体の性能が通常の動物を免疫して得られる抗体と同等もしくはより優れていることを示している。このライブラリーを用いる利点は次の3点に要約できる。(i)抗体単離までの期間が大幅に短縮され、更に多数の抗原に対応できるシステムであること。(ii)単離された抗体はFab型ではあってもヒト抗体であること。(iii)組換えDNA技術を用いて遺伝子操作で作製した抗体遺伝子であるためにV遺伝子の両端にユニーク制限酵素部位が配してあり、最終抗体の形状を完全なIgG型ヒト抗体に変換することも含めて自由に変換することが可能なことである。

平成11年度は本プロジェクトの第二段階を実施する。そこで具体的に標的を設定する必要があるが、抗ウイルス中和抗体としてはサイトメガロウイルス等、臨床的に重要でありウイルス粒子を得易く、又、その感染力を測定する系が利用可能であるウイルスを本学臨床教室と協力して選ぶ。抗腫瘍特異抗体については次の二方向から研究を進める。既に抗腫瘍効果が認められるモノクローン抗体が作製されている抗原に対して直接ヒト抗体を得ること。抗体レベルでのsubtraction法を確立して正常細胞には発現されず腫瘍細胞で特異的に発現されている物質に対する抗体単離を行うことである。少なくともリンパ系細胞のようなクローナルマーカを発現する例では抗体単離が可能である。もう一つの標的は、現在我が国で100種を越える抗原に対して主として製薬会社でマウスモノクローン抗体を単離した後、マウス/ヒトキメラ抗体化及びヒト化抗体作製が進められている。この抗原に対してヒト抗体を単離-大量調製を各製薬会社と協力

してすすめる。

E 結論

我々は1,000億種の独立したクローンからなるヒト型ファージ抗体ライブラリーを作製した。このライブラリーはスクリーニングするだけで様々な抗原に対して特異的に結合する有用な抗体を単離できることが判明した。平成11年度には抗ウイルス中和抗体、抗腫瘍特異抗体、抗毒素中和抗体作製を目指して実施する。具体的には臨床教室と製薬会社と協力して標的を選び、抗体を単離して大量調製を行い、「臨床に役立つ抗体の単離と調製」の目標を達成する。

F 研究発表

1. 論文発表

1. W. Ito & Y. Kurosawa: Characterization of Fv fragments expressed on phage surface. *J. Biochem.* 123, 832-838 (1998).
2. H. Yasui, W. Ito & Y. Kurosawa: Temperature dependency of the thermodynamic parameters in interactions between hen egg-white lysozyme (HEL) and anti-HEL antibody. *J. Biochem.* 123, 827-831 (1998).
3. Y. Iba, N. Hayashi, J. Sawada, K. Titani & Y. Kurosawa: Changes in the specificity of antibodies against steroid antigens by introduction of mutations into complementarity-determining regions of VH domain. *Prot. Engineering* 11, 361-370 (1998).
4. C. Miyazaki, Y. Iba, Y. Yamada, H. Takahashi, J. Sawada & Y. Kurosawa: Changes in the specificity of antibodies by site-specific mutagenesis followed by random mutagenesis. *Protein Engineer.* (in press)

2. 学会発表

1. Iba, Y., Hayashi N., Sawada, J., and Kurosawa, Y. (1998). Changes in the specificity of antibodies against steroid-antigens by introduction of mutations into complementarity-determining regions of VH domain. : The 10th International Congress of Immunology, New Delhi, India, November 1-6.

G 知的所有権の取得状況

本研究で作製したライブラリー、そのスクリーニング法、抗原結合力の高いクローンの作製法と選別法につきましては特許出願をすべく準備を進めております。

