

平成 11 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

平成 11 年度厚生科学研究費補助金(高度先端医療研究事業)

総合研究報告書

人工抗体ライブラリーの作製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（高度先端研究事業）
総括研究報告書

人工抗体ライブラリーの作製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「臨床に役立つヒト抗体を作製すること」を目標に進められた。研究実施期間は平成9-11年度3年間であるが、最初2年間でAIMS-4と名付けた 10^{11} 個の独立したクローンを含む抗体ライブラリーの作製を終了した。更に10数種類の抗原に対して抗体ライブラリーから抗体を単離することを試みたところ各々の抗原に特異的に結合する抗体が各々多種類単離できることが判明していた。そこで平成11年度に於てはもし優れた性質のヒト抗体が利用できるとすれば実際に抗体を用いた治療が行われるであろう疾患を対象に抗体単離を試みることにした。そのような疾患は多数存在するが、先ず最初の試みとして、AIMS-4作製の原理から判断して優れた性質を示す抗体が得られる確率が高い対象を選択することにした。ジフテリア毒素、破傷風毒素、百日咳毒素に対しては日本では3種混合ワクチンとして幼児期の接種が広範に実施されている。そこで我々が抗体ライブラリー作製に際して用いたヒトBリンパ細胞の血液提供者（数10名）の中に優れた中和活性を示す抗体を産生していたヒトが含まれており、その結果AIMS-4の中にもその性質を反映した抗体が含まれていることを期待できる。そして得られるであろうヒト抗体は、例えばジフテリア毒素中和抗体の場合日本での需要は高くないが、国際的に見れば必要とする人は多い。そこでこの三毒素を対象として中和抗体単離を実施することにした。この考えは国立感染研高橋元秀博士との議論で生まれたものであり、共同研究を行うことになった。同様の論理をウイルスにも適用した。サイトメガロウイルスや水痘帯状疱疹ウイルスは大部分の人に広く感染しており、そこで多くの健常人は中和抗体を有している。しかし、何らかの原因で免疫力が低下すると、そのウイルスが増殖して発病する。このようなウイルスに対して中和活性を持つヒト抗体がAIMS-4の中に含まれている可能性は高く、また得られた抗体の社会的ニーズも広範に存在すると判断した。この課題については富山医科薬科大学の白木公康教授と共同研究を行うことにした。具体的には共同研究者から抗原を提供してもらい、こちらで抗体ライブラリーをスクリーニングして抗原に結合する抗体を単離する。その抗体を共同研究者に送って中和活性を測定してもらおう。高い中和活性を示す抗体が見い出せれば、それを完全にヒト抗体の形に遺伝子レベルで変換した後、細胞に導入してヒト抗体を大量調製しようというのが研究戦略の大枠である。最初に選んだジフテリア毒素及び水痘帯状疱疹ウイルス両方について、臨床使用に使えることが期待できる抗体単離に成功した

A. 研究目的

細胞融合を利用したモノクローン抗体作製技術は、マウスの系では確立しており広範に利用されている。具体的手順としては、3段階を経て実施される。精製した抗原を動物に一定間隔をおいて数回注入して（免疫する）、血液中に出現する抗体の力価を追跡する。その抗原に結合する抗体が充分分泌されていると判断できる段階に達すれば動物を殺して脾臓を摘出する。その脾臓からBリンパ球を分画した後、腫瘍細胞と細胞融合を行う。融合細胞を株化した後、各

々の細胞株が分泌している抗体を調べて目的とする抗原と結合する抗体を分泌している細胞をモノクローン抗体産生ハイブリドーマとして確立する。このモノクローン抗体作製技術をヒトに応用することは様々な面で困難であり、事実上ヒトモノクローン抗体を作製することは特殊な例を除き不可能であった。組換えDNA技術を利用し、ファージディスプレイ系を用いたヒト抗体ライブラリー作製技術の開発はこの状況を一変させる可能性がある。本プロジェクトで用いている方法と基本的には同じ原理に基づ

き、世界的には既に数カ所に於いてヒト抗体ライブラリーが作製されている。しかし、この技術の繁用性の高さからみて、我々が日本で独立に抗体ライブラリーを作製し、その中から臨床に役立つヒト抗体を単離しても十分に価値ある成果が得られると判断し、本プロジェクトを開始した。平成10年度までに行われた研究で抗体ライブラリー作製は終了しており、平成11年度には具体的に臨床応用に使われるであろう2例（ジフテリア毒素、水痘帯状疱疹ウイルス）を対象にパイロット的に抗体単離を試みることにした。

B. 研究方法

平成11年度に行った2例は今後行う多数の疾患に対するヒト抗体単離の原型になる方法確立のパイロット実験と位置づけている。

1. ジフテリア毒素中和抗体

ジフテリア毒素はホルマリン処理することによって無毒化したもの（トキソイド）が幼児期に3種混合ワクチンとして多くの子供に接種されている。そのワクチンとして利用されているトキソイドそのものを抗原として用いることにした。スクリーニングは様々な抗原に対する抗体単離のために既に頻繁に用いているチューブに抗原を付着させてその中に抗体ライブラリーを混ぜて抗原-抗体複合体を形成させた後ファージ粒子を回収する。そしてそのファージを増殖させて以上の過程を数回繰り返すpanning法に従って行った。最終的に回収されたファージ粒子はモノクローン化した後、ELISA法で抗原結合性を調べた。抗原結合性を示すファージ抗体については数10種個について、各々抗体をコードする部分の塩基配列を決定した。そのことにより何種類の抗体が含まれているかを知り分類した。各々について抗体をFab-cp3融合型分子として調製し、そのジフテリア毒素中和活性を測定した。その中和活性測定は細胞レベルと動物個体レベルの2通りの方法を用いて行った。中和活性を示す抗体についてはファージ抗体をコードする遺伝子構成から完全なヒト抗体(IgG1)をコードする遺伝子に変換した。この遺伝子は動物細胞で発現できるベクターに挿入される形にしてあり、そのDNAを動物細胞に導入した。選択因子を用いて形質転換株を得た後、抗体の分泌を確かめた。そしてその分泌されたヒト抗体の毒素中和活性を正確に測定することにした。

2. 水痘帯状疱疹ウイルス中和抗体

ウイルス中和抗体単離も基本的にはジフ

テリア毒素中和抗体単離と同じ手順を踏んで行う。富山医科薬科大学の白木教授の研究室で水痘帯状疱疹ウイルス粒子を構成する3種類のタンパク(gE、gB、gH)が精製された。それを抗原として用いることによりpanning法で抗原に結合する抗体をファージ抗体の形で多数単離する。このウイルスについてはその感染力をプラーク形成能で測定するシステムが確立している。そのウイルスのプラーク形成能を阻止する形で抗体の中和活性測定が可能である。後の過程はジフテリア毒素中和抗体単離と同じ手続きで実施する。

C. 研究結果

1. ジフテリア毒素中和抗体単離

抗体ライブラリー(AIMS-4)をスクリーニングすることによりジフテリア毒素(トキソイド)に結合する性質を持つファージ抗体を単離した。3回のpanningにより得たファージ粒子はELISA法により約7割がジフテリア毒素に結合する性質を有していた。その中から更にクローン化を行い100のファージクローンのDNA塩基配列を決定した。その結果、32種の抗体が含まれていた。H鎖のCDR3に相当する部分の塩基配列は各々の遺伝子がVDJ DNA組換えを独立に起こして作られたものかを判断するメルクマールとなる。その観点からみるとVH DJH遺伝子として数種あり、得られたクローンは抗体の成熟を起こすのに貢献したと予想される体細胞突然変異の導入の結果と判断されるものを多く含んでいた。これら32種全てについてジフテリア毒素中和活性を測定した。一つは細胞レベルでジフテリア毒素の作用を抑制するかどうかを測定し、もう一つの方法は動物に対する毒性を抑制するかを測定する方法である。両方の測定方法で、1クローンが強い中和活性を示した。この中和活性は全く独立した実験で再現性良く確認された。ファージ抗体として単離された際に遺伝子機構はFab-cp3をコードする形をしている。それをヒト抗体(IgG1)に変換するにはプロモーターを大腸菌で機能する形から動物細胞用へと更にシグナルペプチドの変換Fc部分の付与等を行う必要がある。抗体ライブラリー作製時点で、抗体V領域の両端にユニークな制限酵素部位を配しているため、ファージ抗体単離後、VH DJH、VL JL DNA断片を切り出し、カセット的に組み込んでヒト抗体を発現するベクターを別途作製した。ジフテリア毒素中和活性を示すクローンについてこの発現ベクターに組み込んだ。これを宿主細胞

に導入して約10 μ g/mlのヒト抗体を分泌する形質転換株を樹立する段階まで研究は進行した。

2. 水痘帯状疱疹ウイルス中和抗体単離

水痘帯状疱疹ウイルス粒子を構成する3種のタンパクgE、gB、gHを用いて抗体ライブラリー(AIMS-4)をスクリーニングした。各々の抗原に結合するファージ抗体をpanning法で濃縮した後、クローン化してELISAによる結合力の測定、そしてDNA塩基配列の決定を通じた分類を行った。各々の抗原に対して30種以上の抗体が単離された。このウイルスについては*in vitro*のプラーク形成能によりウイルスの感染力を測定するシステムが開発されている。そこでウイルスと抗体をincubateしてその後ウイルスの感染能を測定するという方法で抗体の中和活性が測定できる。その結果gHに結合する数種類の抗体がこのウイルスに対する強い中和活性を有することが示された。

D. 考察

細胞融合を用いたモノクローン抗体作製技術は、広範に用いられている優れた方法であるが、ヒト抗体を得る手段としては様々な問題点があり、将来的にも克服できると期待されていなかった。そこでV領域をマウスとしてC領域をヒトとするキメラ抗体、更に進んでV領域のCDR配列のみをマウスとしてそれ以外全てをヒト型にするヒト化抗体等が臨床に使われる抗体作製技術として開発された。本プロジェクトで実施しているファージディスプレイ系を用いたヒト抗体ライブラリー、一方でヒト抗体遺伝子でマウス抗体遺伝子を置き換えたヒト抗体をつくるトランスジェニックマウスの作製が現在ヒト抗体を作り出す方法として注目されている。今回、我々の実施したジフテリア毒素中和抗体の単離及び水痘帯状疱疹ウイルス中和抗体の単離の成功は、臨床に用いることのできるヒト抗体を抗体ライブラリーから単離できることを示している。これは例に用いたこの2疾患にのみあてはまることではない。原理的に考えて、ヒトでワクチン接種が実施されている例及びウイルス感染が広く起こっている疾患全てにあてはまる。

我々が作製した抗体ライブラリー(AIMS-4)を様々な抗原でスクリーニングして得られた抗体の性質を解析すると次のような傾向が認められる。今回用いたヒトの体の中で既に免疫された可能性の高い抗原については、独立した複数回のスクリーニングに

より特定の抗体が毎回再現性よくクローン化される。その中には高結合力(高親和力を含む)のものが含まれる。一方、あるタンパク抗原(その抗原にヒトが出会って免疫されている可能性がない)に対して抗体ライブラリーをスクリーニングすると、スクリーニングの度毎に異なる抗体が得られる。その場合、結合力が低いものが多い。このことは、*in vivo*では二段階で高親和力の抗体がつくられることを忠実に反映している結果と考えられる。そこでこの抗体ライブラリーの利用法として高結合力の抗体が得られることを期待できる疾患について先ず一通り単離する。一方、高結合力の抗体が必ずしも得られないものについては、変異の導入—結合力に基づいた抗体の選別という二段階で抗体を単離するのが望ましいと判断できる。

E. 結論

本プロジェクトは「臨床に役立つヒト抗体単離」を目標に進められた。平成9-10年度に作製したヒト抗体ライブラリー(AIMS-4)を平成11年度にジフテリア毒素中和抗体単離、水痘帯状疱疹ウイルス中和抗体単離を目標に実施し、それが可能であることを示した。今後このライブラリーを利用して抗体が必要な各種疾患に適用する準備が整った。

F. 研究発表

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.* 12, 407-415 (1999).

G. 知的所有権の取得状況

特許取得

「抗体ライブラリー」

平成12年2月22日特許申請書を提出