

Fig. 8 つづき

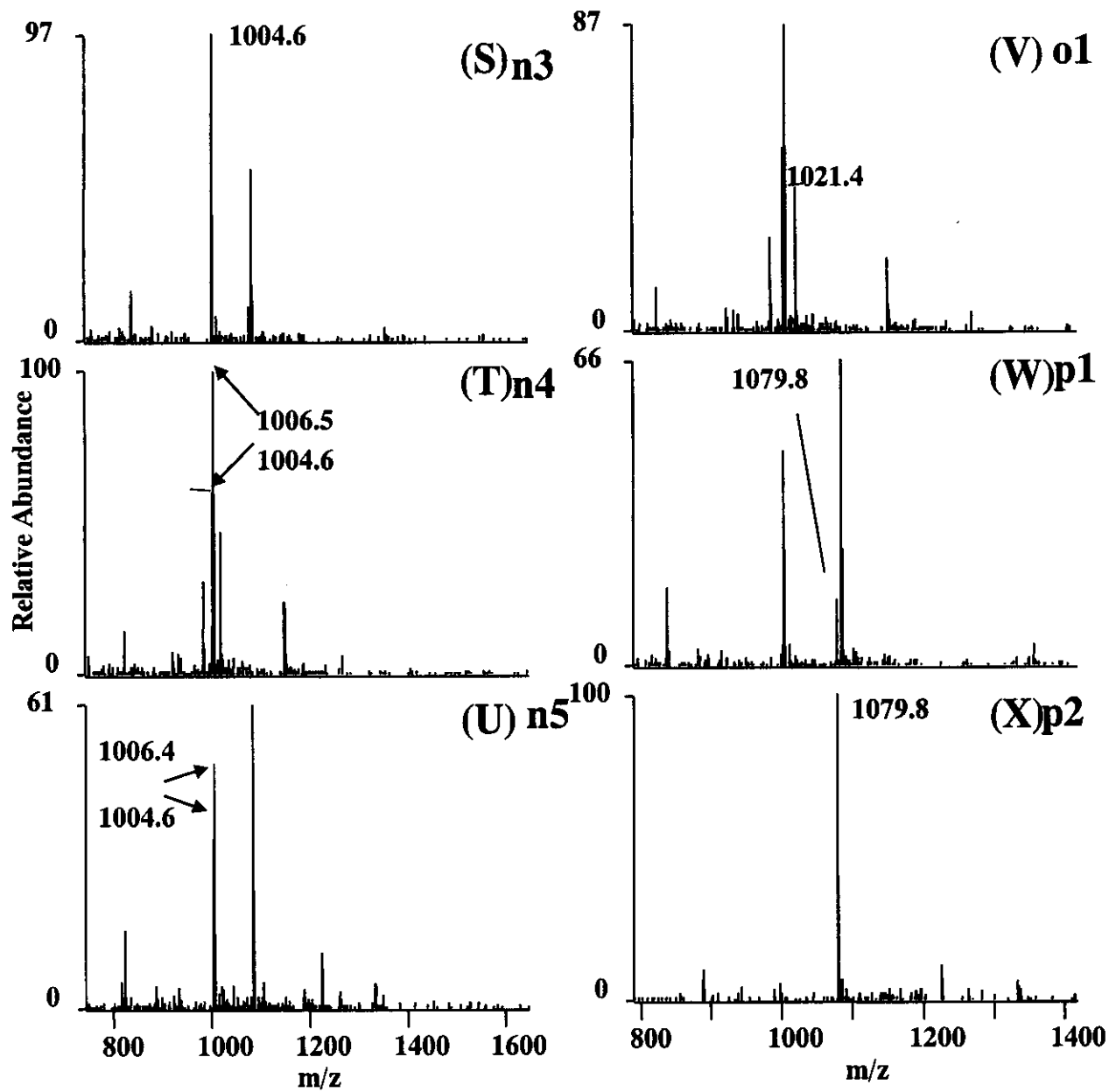


Fig. 8 つづき

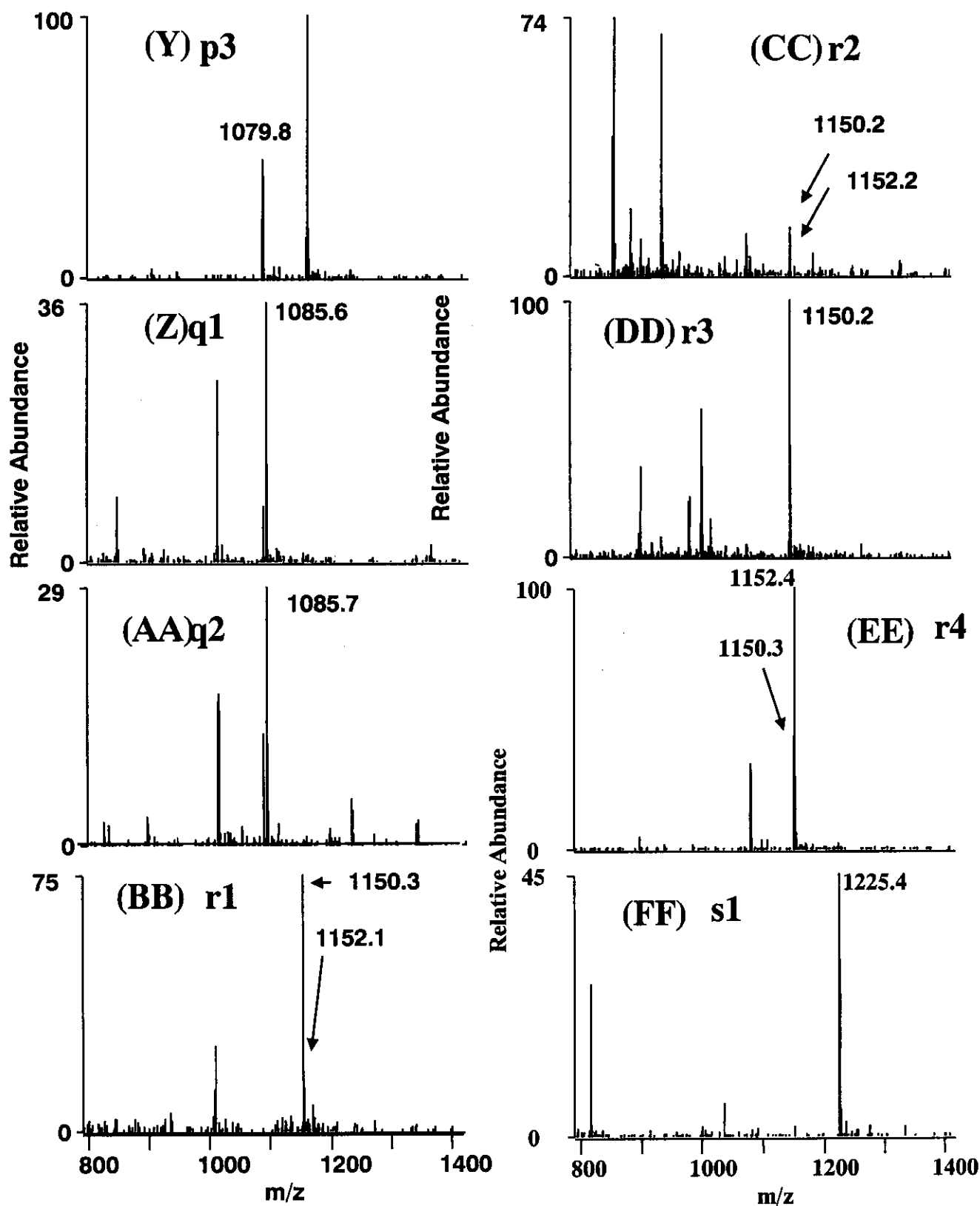


Fig. 8 つづき

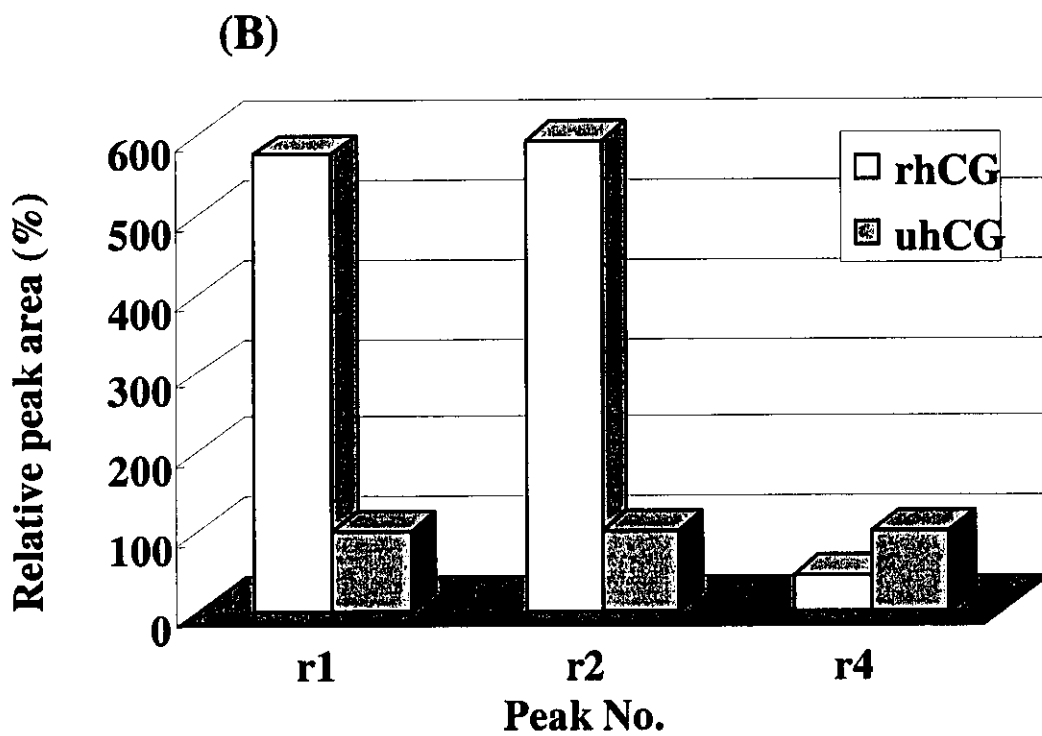
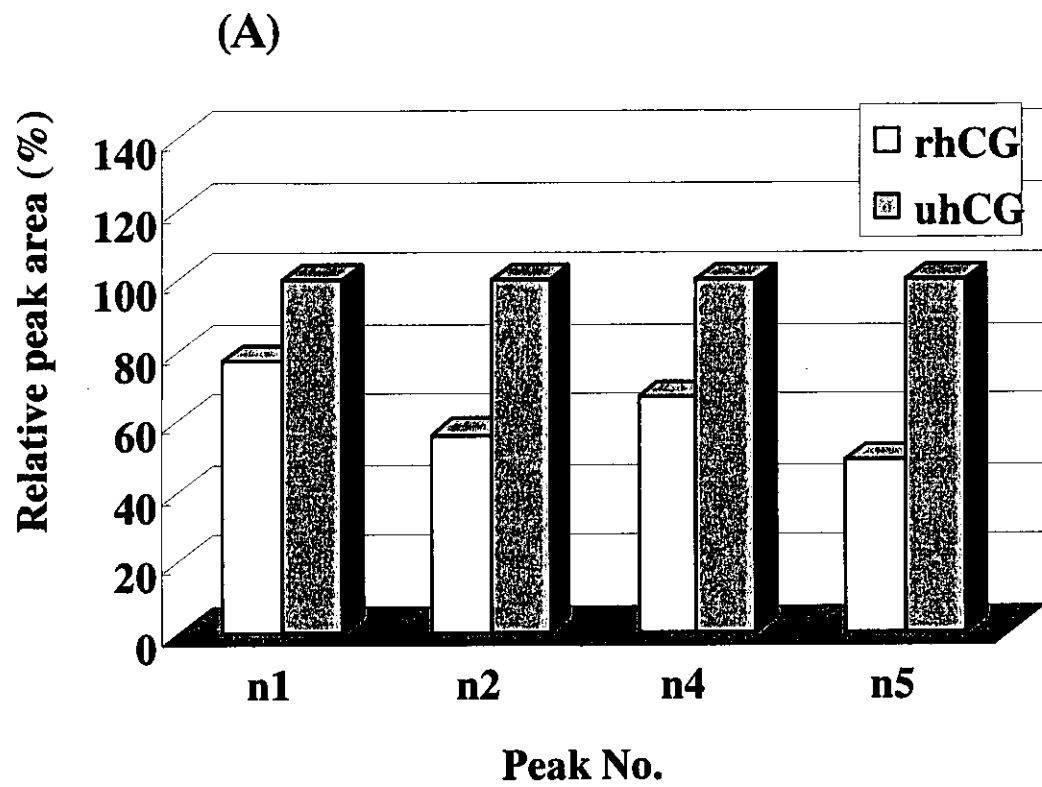


Fig. 9 rhCG及びuhCGに共通して結合している糖鎖の相対結合比

(A) mono-, (B) di-sialylated biantennary

厚生科学研究費補助金 (医薬品等医療技術リスク評価研究事業)
分担研究報告書

医薬品の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究

分担研究者：新見伸吾 (国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部第三室長)

研究要旨

医薬品の品質規格に係る国際的動向を踏まえた評価に関する研究の一環として、抗体医薬品を取り上げ、その現状と問題点について調査研究を行った。

従来のマウスモノクローナル抗体はヒト免疫原性による繰り返し投与時の効果の減弱、アナフィラキシーショックの危険性のため、治療薬への適用は非常に限られたものであった。これら問題点を克服するためヒト型モノクローナル抗体が作成され、そのうち幾つかは現在治療薬として承認されている。ヒト型抗体としてはマウスーヒトキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体がある。マウスーヒトキメラ抗体はマウスモノクローナル抗体のC領域をヒト抗体C領域に置き換えたものである。ヒト化抗体は抗原が実際に結合する超可変領域を残して、それ以外の部分を全てヒト抗体に置き換えたものである。ヒト抗体にはファージディスプレイ法を用いて作成したものと内因性免疫グロブリンをノックアウトしたマウスに機能的なヒトのIgGを導入して作成したトランスジェニックヒト抗体がある。キメラ抗体、ヒト化抗体においては抗原性が著しく減弱したものの、抗原性の問題は依然残されている。ファージディスプレイヒト抗体は多様性が高いが、完全抗体分子型ではないことに起因する有用性に問題点もある。トランスジェニックヒト抗体は現時点で最も天然ヒト由来の抗体に近い。また、マウスを免疫すればヒト抗体を従来のハイブリドーマ法で容易に得ることができる。技術的な制約からIgG全領域の遺伝子をマウスに導入できないため、抗体の多様性ならびにハイブリドーマ取得率の低下などが問題となっていたが、改善されつつある。抗体の作用機序として抗体の直接作用、イデオタイプ反応を利用した腫瘍関連抗原に対する宿主免疫への感作、抗体依存性細胞障害活性、抗体依存性細胞性傷害活性、抗体と毒素あるいはアイソトープとの conjugate による細胞殺傷作用がある。現在、ヒト型抗体としてリツキシマブ (非ホジキンリンパ腫)、トラスツズマブ (乳癌)、インフリキシマブ (クローン病、慢性関節リウマチ) などが日本で認可されている。

A. 目的

抗体医薬の始まりは19世紀終わりのエミール・ベeringと北里柴三郎による血清療法にさかのぼる。彼等は加熱変性させたジフテリア菌毒素をウサギに注射するこ

とにより、ジフテリアに対する抵抗性を獲得させた。さらに、そのウサギの血清を他のウサギに注射すると、ジフテリアに対する抵抗性をワクチンの接種されていないウサギに移せることを発見し、これをヒトに

応用した。その後、ヒト血液から精製したガンマグロブリン製剤が開発され老人や術後の患者の日和見感染症、川崎病の自己免疫病に多用されている。1975年にモノクローナル抗体作成技術がケラーとミルシュタインにより開発されてから、対象となるターゲットに対して高親和性と特異性の高いマウスモノクローナル抗体は基礎研究だけでなく治療薬を目指した膨大な研究が行われてきた。実際、モノクローナル抗体治療薬は①分子化合物に比較して基本的に細胞毒性が低いもしくは無い②比較的長期にわたり血中濃度の維持が容易である。③結合対象となるリガンド選択性・特異性に優れている④抗原の捕捉だけでなく生体内からの排除が可能であるといったメリットがある。しかしながらマウスモノクローナル抗体の治療薬としての利用はヒトへの免疫

原性により繰り返し投与時の効果の減弱、アナフィラキシーショックの危険性のために、非常に限られたものであった。そこで今日までに、免疫原性、アナフィラキシーショックの危険性を低減し、繰り返し投与を可能にするヒト型モノクローナル抗体を作成する様々な技術が生み出された。このようにして作成されたヒト型モノクローナル抗体の一部は医薬品として承認され臨床で用いられており、現在臨床応用を目指して開発中のものも多い(表1、2)。そこで本稿においては抗体医薬の現状と問題点について概説する。

B. 研究方法

ヒト型抗体医薬の作成法、各ヒト型抗体医薬の長所と短所、作用機序ならびに現在認可されている抗体医薬それぞれの特徴に

表1 認可された抗体医薬品 参考文献 35

商品名 (抗体名)	企業	日本での 販売元	タイプ (抗原)	適応症	認可 (年)
Repro® (Abciximab)	Centocor社/ Eli Lilly社		キメラ (gp II ^b III a)	PTCA 後再狭窄	1994
Rituxan® (Rituximab)	IDEC社/Roche 社/Genentech社	全薬工業	キメラ (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	1997
Zenepax® (Daclizumab)	Roche社		ヒト化 (IL-2R)	腎移植	1997
Remicade® (Avakine)	Centocor社	田辺製薬	キメラ (TNF- α)	クローン病 慢性関節リウマチ	1998
Synagis® (Palivizumab)	MedImmune社/ Abott社	ダイナボット	ヒト化 (RSV)	RSV小児感染	1998
Simulect® (Basilicimab)	Novartis社	ノバルティス ファーマ	ヒト化 (IL-2)	腎移植	1998
Herceptin® (Trastuzumab)	Genentech社/ Roche社	日本ロシュ	ヒト化 (HER2)	乳癌	1998
Mylotarg® (Gemtuzumab)	Celltech社/ AHP社		抗癌剤-コンジュゲート (CD33)	急性骨髄性白血病	2000
Zevalin® (Iritumomab)	IDEC社/ Schering AG社		⁹⁰ Y-コンジュゲート (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	2002
Bexxar® (Tositumomab)	Coulter社/ SKB社		¹²⁵ I-コンジュゲート (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	2002

PTCA：経皮的冠動脈拡張術，RSV：呼吸器多核体ウイルス

表 2 開発中の抗体医薬品 (2003 年 1 月時点) 参考文献 14

段階	数					
	合計	キメラ抗体	ヒト化抗体	完全ヒト抗体	マウス抗体	その他
発売中	11	4	5	0	2	0
申請中	3	0	1	1	1	0
フェーズIII	20	1	9	2	8	0
フェーズII	60	7	25	15	4	9
フェーズI	35	5	13	6	6	5
合計	129	17	53	24	21	14

ついて、参考文献 1~45 を中心に調査した。なお、図及び表に記載した文献番号は引用文献を示している。

C. 研究結果

1. 抗体医薬の作成

1.1 キメラ抗体、ヒト化抗体

キメラ抗体は遺伝子組換え技術を用いてマウスモノクローナル抗体の C 領域をヒト抗体の C 領域に置き換えたものである (図 1)。さらにヒト化抗体は抗体タンパク質の三次元構造をもとに、抗原が実際に結合する超可変領域 (CDR1~3) を残して、それ以外の部分であるフレームワーク (FR) を全てヒト抗体に置き換えたものである (図 1)。

以下にマウスハイブリドーマ細胞から、遺伝子として cDNA を用い遺伝子組換え法によるキメラ抗体、ヒト化抗体の作製法を紹介する (図 2)。

1.1.1 マウス抗体遺伝子のクローニング

第一のステップは、マウス抗体産生ハイブリドーマからのマウス抗体をコードする遺伝子 (以下マウス抗体遺伝子) のクローニングである。ハイブリドーマ細胞より RNA を抽出し、①cDNA を作製後、ブランクハイブリダイゼーション法あるいは PCR 法により抗体遺伝子をクローニングするか、②RNA より直接 PCR 法により抗体遺伝子をクローニングする方法が用いられている。ハイブリドーマ細胞は、目的の抗体遺伝子以外に、

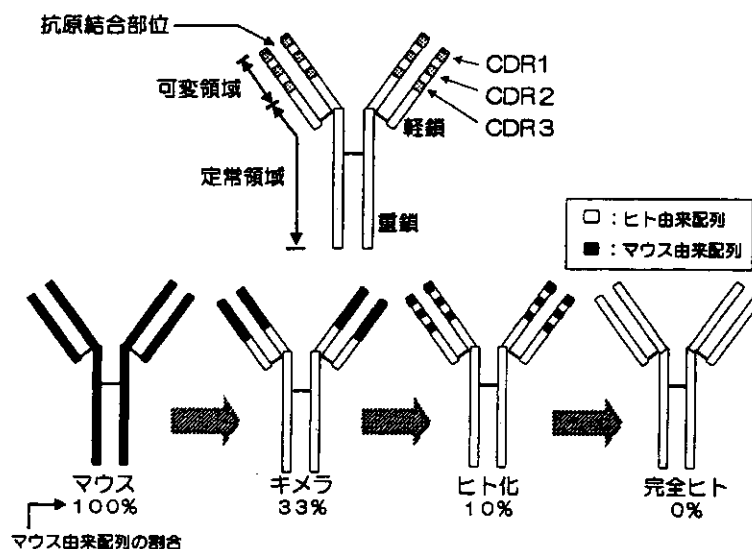


図 1 抗体の構造 (上段) およびマウスモノクローナル抗体のヒトに対する抗原性低減技術の進展 (下段) 参考文献 18

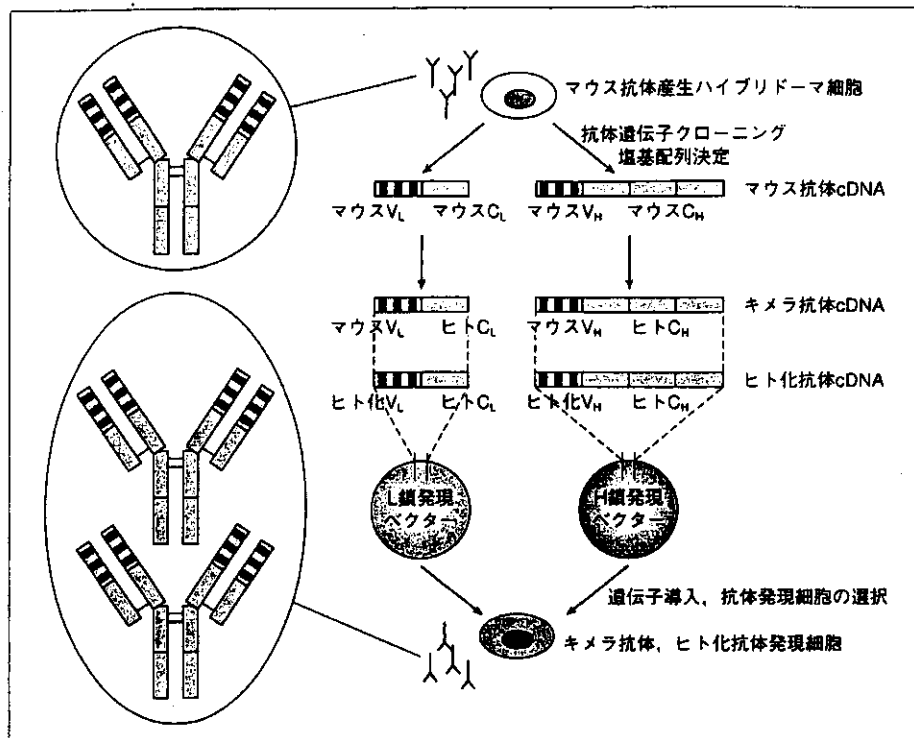


図2 キメラ抗体、ヒト化抗体発現の概略 参考文献 22

融合パートナーのミエローマ由来の抗体遺伝子、タンパク質に翻訳されない偽抗体遺伝子が含まれていることもある。従って、精製したモノクローナル抗体V領域のアミノ酸配列を一部決定し、クローニングした抗体遺伝子と一致しているかにより、クローニングした遺伝子が目的の抗体遺伝子であるかどうかの確認が非常に重要である。

1.1.2 キメラ抗体遺伝子およびヒト化抗体遺伝子の作製

キメラ抗体は、クローニングしたマウス抗体のV領域遺伝子にヒトのC領域遺伝子を連結し、適当な発現ベクターに挿入して培養細胞で生産する。また、抗体産生ハイブリドーマのマウスイムノグロブリンC領域をヒトイムノグロブリンC領域に組換える相同組換え法やトランスジェニックマウスによっても作成される。

ヒト化抗体遺伝子の作製は複雑なステッ

プからなる(図3)。ヒト化抗体作製の第一ステップでは、クローニングしたマウス抗体V領域のCDR配列とヒト抗体V領域のFRから成るV領域をコードする遺伝子を構築する。ヒト化抗体作製における最も重要な点は、CDRを移植するヒトFR領域のデザインである。マウス抗体のCDRを単純にヒトFRへ移植した抗体では、結合活性の低下、消失がみられる。これはマウスFR領域中のいくつかのアミノ酸がCDRの高次構造維持に大きな影響を与えており、それらのアミノ酸残基をCDRとともに移植しなければならないことを示している。CDRの高次構造に影響を与えるアミノ酸残基としていくつか同定されているが、その法則は確立されておらず、コンピューターモデリングなどを組み合わせて個々の抗体で試行錯誤しているのが現状である。また、この方策として目的のマウス抗体V領域と最も高いホモ

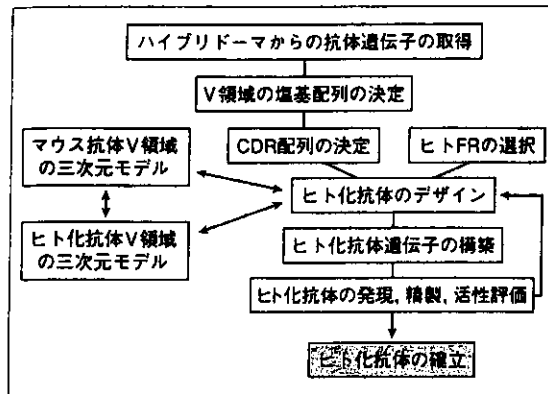


図3 ヒト化抗体作製のフローチャート 参考文献 22

ロジーを示すヒト抗体V領域を選択し、そのFR領域を用いている場合もある。

1.1.3 抗体H鎖およびL鎖遺伝子発現ベクターの作成および動物細胞における発現

現在、上市されている遺伝子組換え抗体は抗体H鎖およびL鎖遺伝子が挿入された動物細胞用の発現ベクターを動物細胞に導入し、発現したものである。

上市された抗体の製造細胞で実績があるのは、チャイニーズハムスター卵巣由来のCHO細胞、マウスミエローマ由来のNS0細胞およびSP2/0細胞である。動物細胞が産生に用いられるのは以下の理由による。まず、抗体はH鎖およびL鎖各2本が複数のS-S結合を介して結合しており、正確な立体構造の構築には動物細胞での発現が最適である。また、抗体のFc領域にはN型糖鎖が結合しており、糖鎖はC_H2ドメインの立体構造の維持、複数の後述するエフェクター活性に必須である。従って、動物細胞で発現しないと抗体のエフェクター活性が損なわれてしまう。この点は以降に示すヒト抗体においても同様である。

動物細胞用の発現ベクターは以下に示すような複数のユニットから構成されている。
①抗体発現ユニット：抗体遺伝子、抗体の転写を促進するプロモーターエンハンサー、

抗体RNAを安定化させるスプライシングシグナルより構成されている。②選択マーカー：動物選択マーカー（G418耐性遺伝子など）、大腸菌選択マーカー（アンピシリン耐性遺伝子など）、③遺伝子増幅ユニット：抗体発現を上昇させるために抗体遺伝子のコピー数を上昇させる遺伝子増幅ユニット

（dhfr遺伝子系、glutamine synthetase系など）である。

宿主の動物細胞に発現ベクターをエレクトロポレーション法、リポフェクション法などで導入する。導入した細胞群より、薬剤耐性（G418など）を指標として発現ベクターが導入された細胞を選択する。選択された細胞のうちキメラ抗体、ヒト化抗体の発現が認められた細胞についてはさらに遺伝子増幅（dhfr遺伝子系など）を行い、安定なキメラ抗体、ヒト化抗体高発現細胞を樹立する。

キメラ抗体あるいはヒト化抗体高発現細胞を培養し、培養上清よりキメラ抗体あるいはヒト化抗体を精製する。初期評価用のキメラ抗体あるいはヒト化抗体はプロテインAカラムを用いて容易に精製可能である。

1.2 ファージディスプレイヒト抗体

ファージディスプレイ法は大腸菌ウイルスの一つであるM13やT7などの繊維状ファ

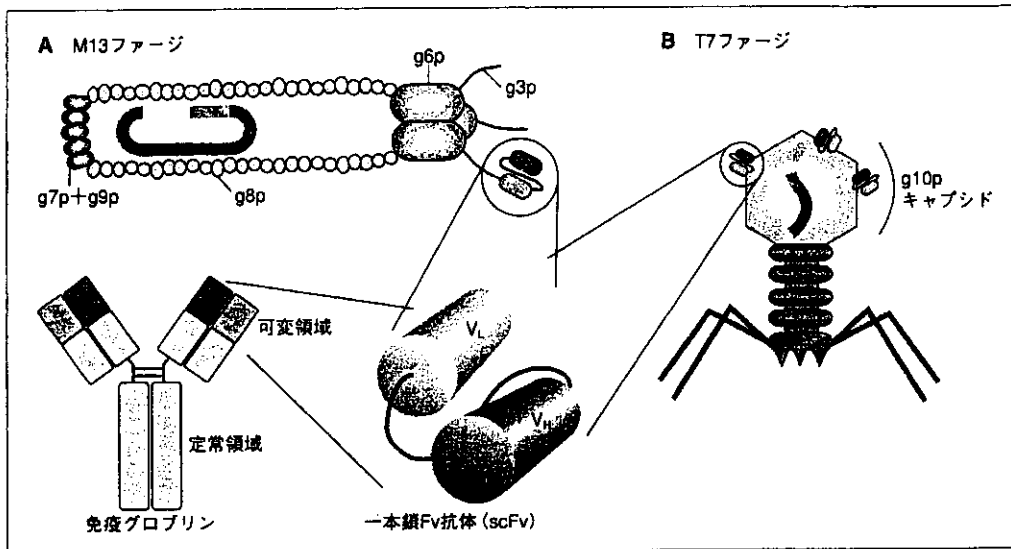


図4 ディスプレイファージの構造 参考文献8
 ージのコートタンパク質(g3pやg10pなど)のN末端側にファージの感染性を失わないよう外来遺伝子を融合タンパク質として発現させるシステムである(図4)。一度に 10^7 種類以上の多種類の分子種を呈示したライブラリーを構築でき、また粒子ごとに目的の機能や性質をもった分子種を選択できる。その技術を用いて外来遺伝子として抗体の結合部位である2つのポリペプチド鎖 V_H と V_L を短いリンカーで直列につないだ一本鎖をFv(single-chain FV; scFv)ファージにディスプレイさせたものが抗体ファージ

ライブラリーである。そしてファージライブラリーからパンニングと呼ばれる固相化された抗原分子上で特異的抗体ファージを濃縮する操作を繰り返して特異的抗体ファージをスクリーニングする(図5)。それを最終的にファージから切り離したものがファージディスプレイ抗体である。

1.2.1 抗体ファージライブラリーの種類

現在、世界中で様々な抗体ライブラリーが作製・報告されているが、その抗体遺伝子ソースの性質の違いに応じて、以下の3つに分類される(図6)。

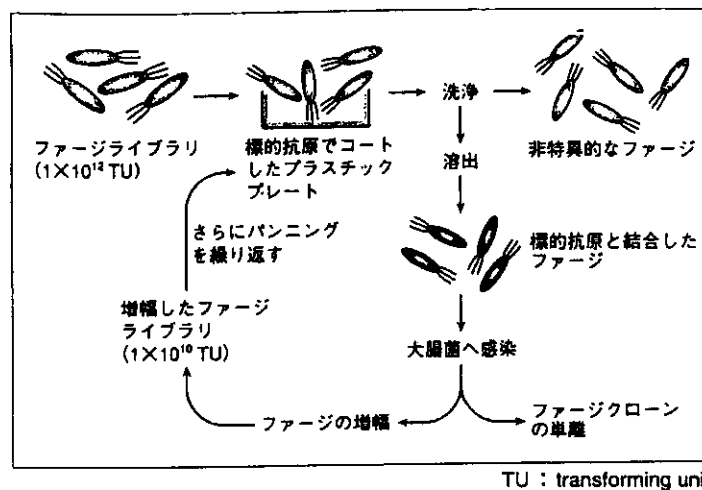


図5 ファージディスプレイライブラリーを用いたパンニング方法 参考文献8

ライブラリーの種類	合成	ナイーブ	非免疫	immune
使用組織	ヒト組織	末梢血、骨髄、扁桃腺などのリンパ球		感染症回復者や対象抗原をワクチン接種したあるいは自己抗体を保有する患者のリンパ球
V遺伝子の由来	再構成されていないV遺伝子断片	IgM mRNA由来再構成されたV遺伝子		IgG mRNA由来再構成
V遺伝子の組成	コントロール可能	コントロールは困難		
CDRの由来	合成・混合	天然型		
ライブラリーの構築		基本的に1回	抗原ごとに作製	
得られる抗体の親和性	ライブラリーのサイズと多様性に依存?			ライブラリーサイズは小さくても、(10 ⁶ 程度)目的の抗原に対して比較的高い親和性を有するクローン分離可能
特異性	ほとんどの抗原		主に標的抗原	

図6 合成、ナイーブ、非免疫、immune各ライブラリーの比較：ファージディスプレイ抗体ライブラリーの作製方法による分類 参考文献 38

1. 2. 1. 1 免疫ライブラリー

感染症回復者や対象抗原をワクチン接種して血中抗体価を上昇させたヒトや、自己抗体を保有する患者、担癌患者などのリンパ球を出発材料として RT-PCR により増幅した V 遺伝子より構築したライブラリーである。中和抗体を有する各種感染症に対する抗体の創出に有効と考えられる。

最初から目的抗体遺伝子がライブラリー中に多く含まれていることから、比較的小さなサイズのライブラリーからでもかなり高い確率で特異性、親和性の高いヒト抗体を単離することが可能である。一方、対象抗原によっては、リンパ球ソースの入手方法の点など倫理的な面で問題となることもある。さらに対象抗原ごとにあるいは患者ごとにライブラリーを構築しなければならないため、手間がかかるという欠点がある。本法により、ヒト第VIII因子 (FVIII) に対するインヒビター抗体を有する患者より FVIII に高い親和性 ($K_d=10^{-11}M$) を有し、FVIIIの活

性を阻害する scFv クローンが得られている。

1. 2. 1. 2 ナイーブ/非免疫ライブラリー

正常なヒトが保有する V_H 、 V_L 遺伝子を RT-PCR により分離し、ランダムに組み合わせた抗体可変領域ドメインを提示したライブラリーである。ヒトがもともと生体内に有し、産生している抗体可変領域を組み合わせるため、ヒト抗原に対する治療用のヒト抗体作製に、最もよく利用されている。通常、正常人の末梢血、骨髄、扁桃腺などのリンパ球を出発材料とし、複数のドナーを用いることでより多くの多様性を有するライブラリーを構築する。このライブラリーでは用いるドナーがどのような疾病歴、抗体価、遺伝系などのバックグラウンドを有するかなどの選択が難しく、V 遺伝子の組成や由来のコントロールに課題がある。厳密に言えば抗原感作によるクラススイッチが起こっていないという観点から、IgM クラスの mRNA のみを V_H 遺伝子の増

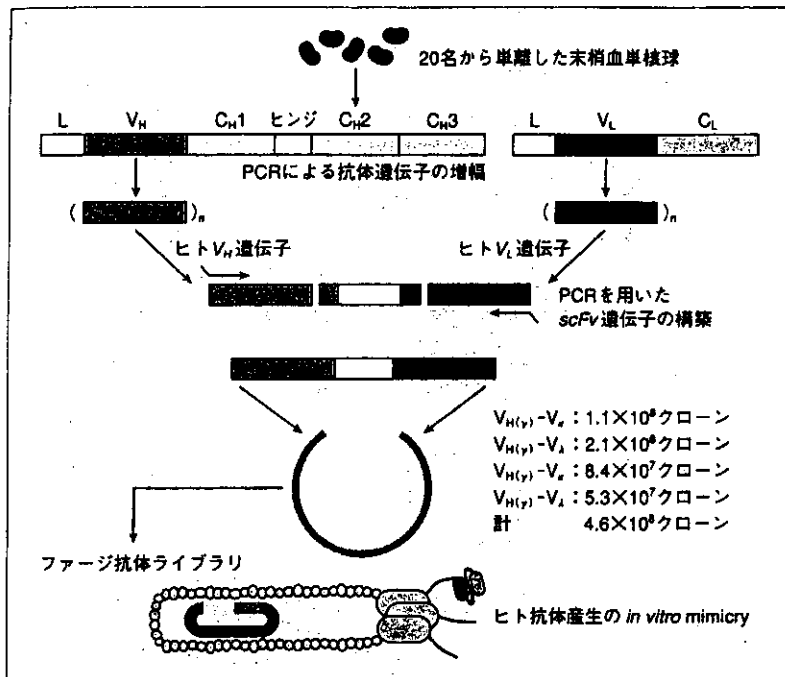


図7 ナイープライラリー構築法の概略 参考文献8

幅に用いているものが特にナイープライブラリーと呼ばれる。以下にヒト抗体ライブラリーの構築 (B細胞を出発材料としたナイーブ/非免疫ライブラリーの場合) 法の概略を示す(図7)。

ヒトリンパ球由来 mRNA から、イムノグロブリンの γ 、 μ 、 κ 、 λ 鎖の定常領域に特異的なプライマーを用いて、V 遺伝子の cDNA を作製する。次に、各遺伝子 (γ 、 μ 鎖由来の V_H ならびに κ 、 λ 由来の V_L) を V 遺伝子ファミリーに特異的な DNA プライマーのセットを用いて V 遺伝子の cDNA を作製する。次に、各遺伝子 (γ 、 μ 鎖由来の V_H ならびに κ 、 λ 由来の V_L) を V 遺伝子ファミリーに特異的な DNA プライマーのセットを用いて合成し、それらリンカーDNA を用いて PCR により連結し、scFv 遺伝子を作製する。それをファージタンパク質 g3p の N 末端に融合タンパク質遺伝子としてファージミドベクター上で連結させ (図4)、大腸菌に形質転換後、ヘルパーファージを用い

て、ファージディスプレイ抗体ライブラリーを調製する。

1.2.1.3 合成ライブラリー

ヒト B 細胞内で実際に抗体産生に用いられている遺伝子を選び、V 遺伝子断片と CDR3 領域に相当する適当な長さのランダムなアミノ酸配列をもつ合成 DNA を用いて抗体可変領域遺伝子を構築したライブラリーである。最初から機能的な scFv を産生する V_H と V_L 遺伝子の組み合わせでライブラリーを構築することができるため、得られる抗体の発現効率や安定性が高いとされる。人工的なランダムオリゴ DNA を用いているため、ゲノム中の抗体遺伝子のみを利用した抗体ライブラリーより高い多様性が得られる。逆に特定の CDR 領域のみの多様性であるため、他の CDR 領域が多様性に寄与するような抗体は得られない。

1.3 トランスジェニックヒト抗体

完全なヒトモノクローナル抗体取得のもう一つの戦略は、ヒト抗体を産生するトラ

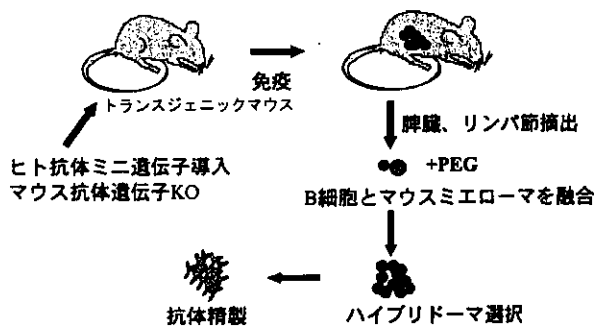


図8 トランスジェニックヒト抗体技術
参考文献 20

ンスジェニック動物の利用である。内因性免疫グロブリン (Ig) をノックアウト (KO) したマウスに機能的なヒトの Ig 遺伝子を導入すれば、マウス抗体の代わりに多様な抗原結合能を持つヒト抗体が産生されると想像される。さらに、このマウスを免疫すればヒトモノクローナル抗体を従来のハイブリドーマ法で容易に得ることが可能と考えられる。

1.3.1 ヒト抗体重鎖、軽鎖ミニ遺伝子を導入したヒト抗体産生マウス

ヒト抗体重鎖、軽鎖ミニ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスとマウス内在性抗体遺伝子を破壊したノックアウトマウスを掛け合わせてヒト抗体産生マウスを作成する (図8)。抗原を接種したヒト抗体産生マウスから通常のハイブリドーマ法によりヒトモノクローナル抗体を作成する。また、抗原を接種したヒト抗体産生マウスの抗体産生細胞を胸腺から分離し、抽出した遺伝子を CHO 細胞に導入しヒト抗体を産生させる技術も開発されている (図9)。本法により IL-8、EGFR、TNF- α 、CD4 などに対するヒト抗体が得られている。しかしながら、本法では用いるベクターにクローン可能な DNA 長は通常数 kb から数百 kb であり、ヒト抗体遺伝子の全長 (重鎖 1.5Mb、軽鎖

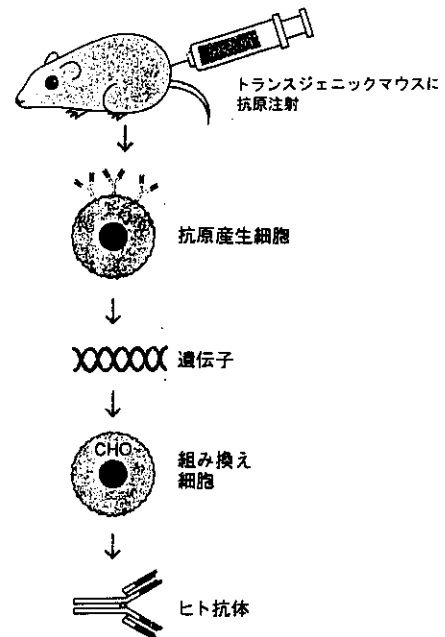


図9 アブジェニクス社のヒト抗体作成技術
参考文献 14

κ 2Mb、軽鎖 λ 1Mb) を入れることはできない。また、ヒト抗体の一部 (IgG の定常領域) はコスミド、BAC (バクテリアの人工染色体)、YAC (酵母の人工染色体) にはクローン化できない。

一方、ヒト Ig 遺伝子において例えば、重鎖の場合、14 番染色体上の約 1Mb にわたってクラスターを形成している約 80 種の V 断片、約 30 種の D 断片、6 種の J 断片が様々な組み合わせられた VDJ エクソンが抗原結合部位をコードするが、この過程 (VDJ 組換え) が抗体の多様性に大きな役割を果たしている (図10)。軽鎖 κ (2 番染色体、約 2Mb)、軽鎖 λ (22 番染色体、約 1Mb) 遺伝子についても同様である。従って、本法ではヒトで観察されるものと同様に多様な抗体レパートリーをマウスで再現するには限界があった。

1.3.2 KM マウス

このような問題を解決するためキリンビール社は以下のようにしてヒト抗体重鎖お

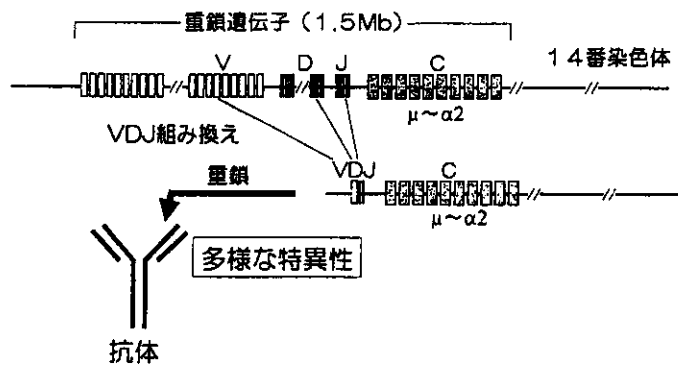


図10 ヒト抗体重鎖遺伝子の構造とVDJ組換えによる多様性生成
参考文献 18

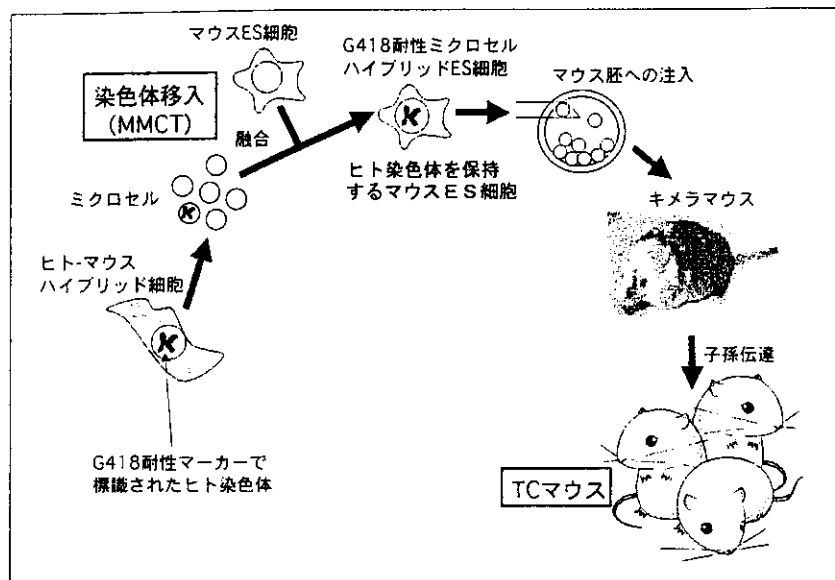


図11 トランスクロモマウス作成法の概略
参考文献 18

よび軽鎖 κ 遺伝子の全種類を導入したヒト抗体産生マウスを作製、ヒト抗体を産生することに成功した (図 11)。まず、ヒト-マウスハイブリッド細胞の独立クローンからなるライブラリーをスクリーニングし、Ig 遺伝子を含むヒト染色体自然断片 (human chromosome fragment; hCF) のなかで重鎖 : 14 番染色体由来と軽鎖 κ : 2 番染色体由来を選抜した。選択細胞を 48 時間程度コルセミド処理することにより 1~数本の染色体が取り込まれた核膜構造体であるマイクロセルを形成させた。このような状態の細胞にサイトカラシン B を加えて遠心分離して脱

核させ、染色体が 1 つ 1 つ核膜、細胞膜に包まれたマイクロセルを分離した。単離したマイクロセルと染色体受容細胞 (マウス ES 細胞) をポリエチレングリコールで融合した。このような一連の操作はマイクロセル融合法と呼ばれる。この融合細胞を 8 細胞期受精卵に注入して、擬似妊娠雌マウスの子宮へ移植する。得られたキメラマウスは ES 細胞由来の体細胞においてヒト染色体断片を保持し、導入したヒト染色体上のヒト遺伝子を組織特異的に発現させた。このようにヒト染色体をもつトランスジェニックマウスはトランスクロモマウス (TC マウス) と呼ば

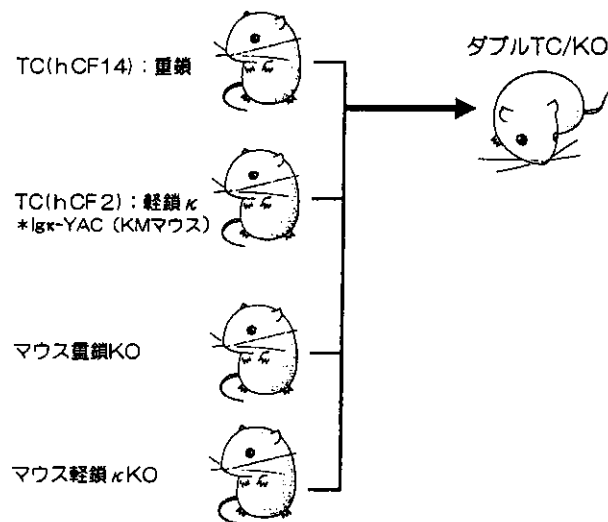


図12 ヒト抗体産生マウス (ダブルTC/KO) の作製 参考文献 18

れる。ヒト抗体重鎖遺伝子を含む 14 番染色体断片を保持する TC マウス、ヒト抗体軽鎖 κ 遺伝子を含む 2 番染色体断片を保持する TC マウス、内在性マウス抗体重鎖遺伝子を破壊したマウス (KO マウス)、内在性マウス抗体軽鎖 κ KO マウスを交配することにより、4つの形質をすべて保持するヒト抗体を作るダブルTC/KOマウスを作成した (図12)。このヒト抗体産生マウスは、ヒト抗原を免疫することにより抗原特異的なヒト抗体 (IgG) 力価が上昇し、その脾臓から抗原特異的なヒト IgG を産生するハイブリドーマクローンが取得された。しかし、そのハイブリドーマ取得率は、正常マウスの 10%程度であり、その原因はヒト第 2 染色体の保持率が ES 細胞及び体細胞において低いことによる (表 3)。

一方、Medarex 社のヒト抗体産生マウス (HuMab) はヒト Ig κ 鎖遺伝子の 50%を含むが、重鎖遺伝子は 10%程度しか含まないため、抗原に対する応答性が必ずしもよくないという問題点があった (表 3)。ヒト Ig κ 鎖遺伝子については、一種的可変領域クラスターが倍化した構造のため、一方のクラスター (50%) を含む HuMab マウスにおいても、100%含む場合と比較して遜色のない κ 鎖の多様性が生み出されていると考えられる。さらに、HuMab マウスにおいては、Ig κ 鎖を含む酵母染色体ベクター (Ig κ -YAC) がマウス染色体 DNA に挿入されているため、安定に保持される。そこで、ダブルTC/KOマウスの不安定な hCF2 の代わりに Ig κ -YAC を導入するという改良がなされた。実際にはダブルTC/KOマウスをヒト抗体軽

表3 ヒト抗体マウスの改良 参考文献 3

	KMマウス (Kirin/Medarex社)	TCマウス (Kirin)	HuMabマウス (Medarex社)	通常マウス
重鎖遺伝子	ヒト V_H (81) 全種類	ヒト V_H (81) 全種類	ヒト V_H (4)	マウス V_H 全種類
軽鎖 κ 遺伝子	ヒト V_K (38) 全種類	ヒト V_K (76) 全種類 $\times 2$	ヒト V_K (38) 全種類	マウス V_K 全種類
定常領域 サブクラス	IgM, D, G1 ~ G4, A1 ~ A2, E すべて	IgM, D, G1 ~ G4, A1 ~ A2, E すべて	IgM, D, G1	マウス定常領域 すべて
安定性	OK	軽鎖 2 番染色体断片が 不安定	OK	OK
ハイブリドーマ 取得効率	よい	ハイブリドーマが不安定なため、 取得効率低下	V_H が少数のため、 抗原への反応性弱い	よい

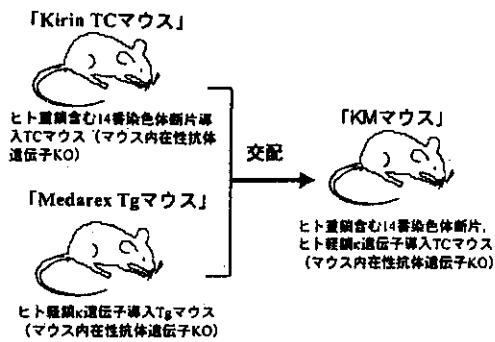


図13 KMマウスの作製 参考文献 25

鎖 κ 領域全域の 50%を含んでいる Medarex 社の HuMAb マウスと交配させ、ヒト 14 番染色体断片とヒト軽鎖 κ トランスジーンとを保持する KM マウス (Kirin-Medarex マウス、KM マウス™) を作成した (図 13)。作成された KM マウスを用いたハイブリドーマの取得率、得られた抗体の特異性は、通常のマウスを用いた場合と比較して遜色ない結果が得られている (表 3)。

1.3.3 KM マウスの品種改良

1.3.3.1 KM (Fc γ RIIb-KO) マウス

免疫するヒト抗原によってはアミノ酸配列あるいは立体構造上、マウスのものと非常に近い、同一である場合、抗体が得られにくいことがある。そのような場合に対処するため、自己抗体を産生する Fc γ RIIb-KO マウスの形質を入れた KM (Fc γ RII

b-KO) マウスも作成されている。

IgG の Fc 領域と結合する Fc 受容体である Fc γ RIIb は ITIM (immuno tyrosine inhibitory motif) を細胞質に持つ膜タンパク質である。過剰な抗原・抗体複合体の IgG Fc 領域が B 細胞上の活性化シグナルを入れる Fc 受容体 (Fc γ RI) と同時に抑制性シグナルを入れる Fc γ RIIb と結合すると、B 細胞への活性化シグナルは遮断され、B 細胞にアポトーシスが誘導され、過剰な抗体産生が抑制される (図 14)。そこで、寛容が打破された Fc γ RIIb-KO マウスの形質を KM マウスへ導入するため、交配を行い、KM (Fc γ RIIb-KO) マウスが作製された。このマウスをウシコラーゲンタイプ IV で免疫し、ウシとマウスのコラーゲンに共通のエピトープ (抗原決定部位) に反応するヒト抗体の有無が調べられた。通常 KM マウスではマウスコラーゲンに反応するヒト IgG 抗体は血清中に観察されなかった。一方、KM (Fc γ RIIb-KO) マウスではマウスコラーゲンに結合する抗体を生産するハイブリドーマが得られた。

1.3.3.2 H-2D 導入 KM マウス

細胞表面の膜タンパク質を認識するモノ

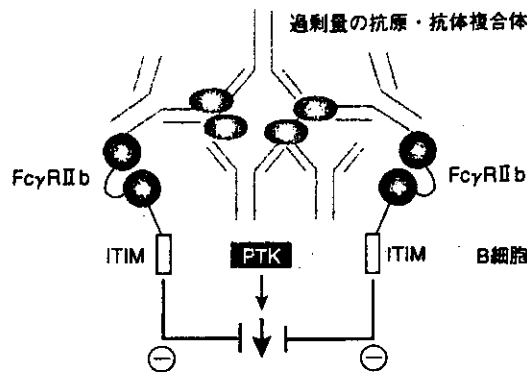


図14 Fc γ RIIbの機能 参考文献 3

クローナル抗体を取得する場合に、ヒト組換えマウス細胞を免疫する方法が用いられる。その際マウスに主要組織適合抗原複合体が異なるマウス細胞を注入すると、強い免疫反応が引き起こされる。このような場合には、免疫原となる組換えマウス細胞と KM マウスの遺伝的背景(バックグラウンド)を一致させることが望ましい。通常の KM マウスは、H-2k (C3H) と H-2b (C57BL/6) のミックスバックグラウンドであるが、場合によっては H-2d (Balb/c) のバックグラウンドの入った KM マウスも望まれる。そこで、Balb/c マウスとの交配により、H-2d 形質の入った雑種マウスである KM (H-2d) も作製されている。

1.3.4 HAC マウス

ヒト 2 番染色体の保持率低下を克服する方法として他のアプローチも試みられている。それは軽鎖遺伝子を安定な 14 番染色体断片上に組み込み、ヒト人工染色体 (human artificial chromosome; HAC) を作成する

方法である。そこで、テロメア配列を挿入することでヒト染色体を任意の部位で切断する方法を確立し、さらには染色体上に loxP 配列を組み込み、Cre リコンビナーゼを作用させることでヒト 14 番染色体上にヒト 22 番染色体断片を転座させ、ヒト重鎖遺伝子とヒト λ 鎖遺伝子を 1 つの染色体にもつ、HAC が作成された (図 15)。実際にはヒト 14 番染色体由来 hCF20 を保持する DT40 細胞において、相同組換えにより loxP 配列が SC20 上の RNR2 遺伝子座に導入された (DT40/SC20)。この loxP 部位は様々なヒト染色体を転座させるための、いわばクローニングサイトといえる。クローニングするヒト染色体領域としては、ヒト 22 番染色体上の Ig λ 鎖遺伝子周辺 10Mb を選んだ。インタクトな 22 番染色体を保持する DT40 細胞において、ヒトテロメアリピート配列を相同組換えにより LIF 遺伝子座に挿入すると、この部位に新たなテロメアが生成した短い染色体が得られる。続いて loxP 配列を

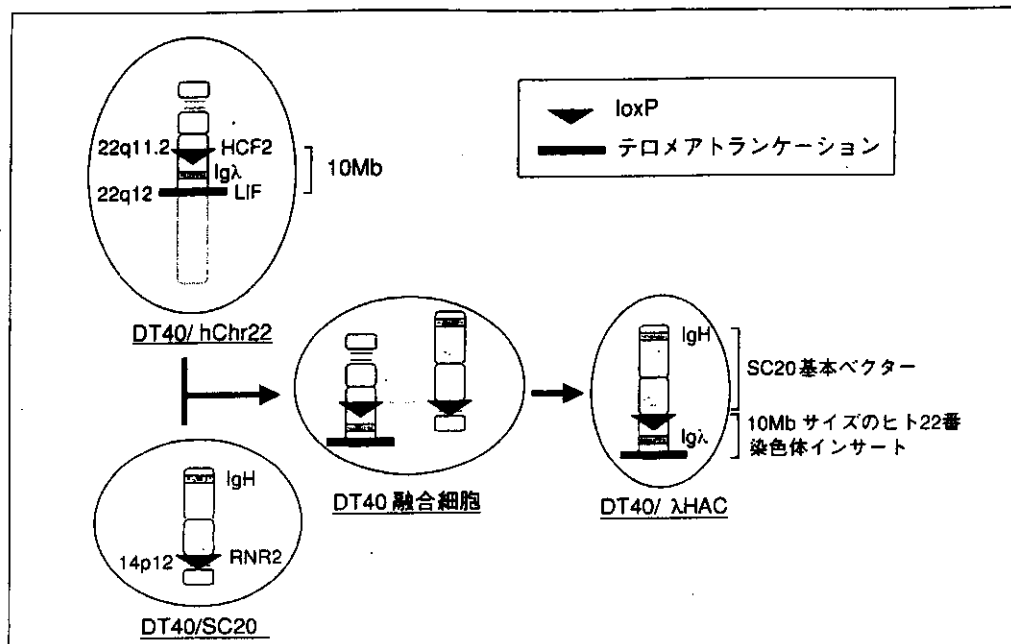


図 15 ヒト人工染色体 (HAC) 構築法の概略 参考文献 18

相同組換えにより HCF2 遺伝子座に挿入した (DT40/hChr22)。次に SC20 保持 DT40 細胞と 22 番染色体保持 DT40 細胞とを融合して 2 本のヒト染色体断片を保持する DT40 融合細胞が作製された。この DT40 細胞に Cre 組換え酵素発現ベクターを導入すると、2 種の染色体断片の組換えによる転座が起こる。こうして得られた HAC (λ HAC) は前述の TC マウス作成と同様にしてマウス ES 細胞に導入され、HAC を持つキメラマウスが作成される。同じ染色体断片由来の 10Mb 領域を含む λ HAC は 1 分裂あたり 99.8% という非常に高い安定性を示した。この安定性は基本ベクター SC20 と同等であり、染色体クローニングにより不安定な hCF 由来の染色体領域を安定化できることが示された。さらにキメラマウス血清においては、ヒト Ig 重鎖、 λ 鎖タンパク質が共に検出されただけでなく、免疫したキメラマウスから抗原特異的なヒトモノクローナル抗体 (ヒト IgG およびヒト Ig λ からなる) を分泌する

ハイブリドーマも取得されている。

1.3.5 HAC ウシ

以下のようにして λ HAC 保持クローンウシ (ヒトポリクローナル抗体産生ウシ) も作製されている (図 16)。

λ HAC 含有 CHO 細胞から前述のマイクロセル融合法により、 λ HAC をウシ繊維芽細胞に導入する。この λ HAC 含有ウシ細胞の核をあらかじめ除核したウシ未受精卵へ核移植し、この再構築胚を発生させ、 λ HAC ウシ胎児を作製する。ある程度成長させた後、この胎児から繊維芽細胞を大量に調製し、 λ HAC ウシ細胞バンクを作製する。この細胞バンクから再度、未受精卵に核移植する作業を大規模に繰り返し、HAC 保持クローン牛を作製する。

このようにして作製されたクローンウシ胎児において HAC ベクター上のヒト抗体遺伝子の発現を調べた結果、内在性ウシ抗体遺伝子と同調して、脾臓などのリンパ組織特異的にヒト抗体重鎖 (IgH)・ λ 軽鎖 (Ig

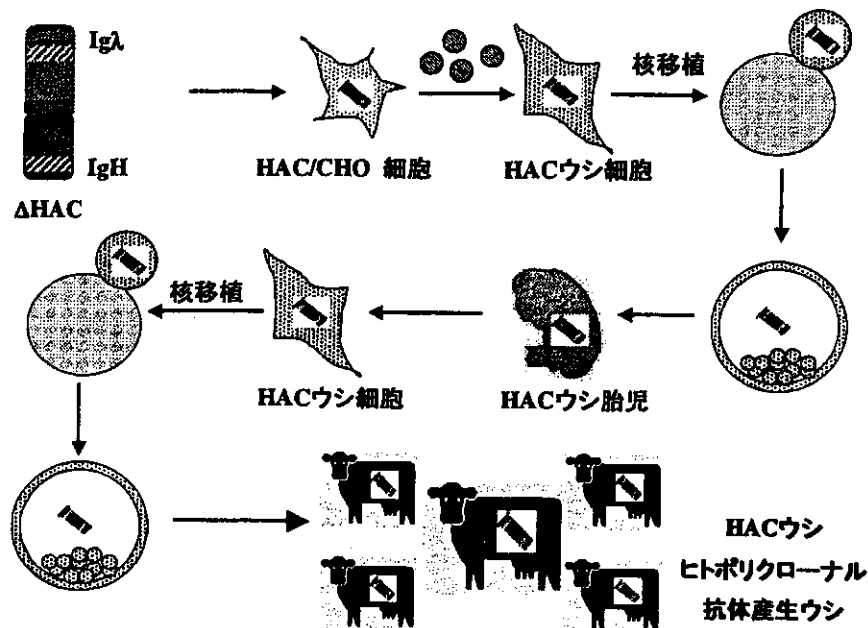


図16 ヒトポリクローナル抗体産生(HAC)ウシの作製法 参考文献 4

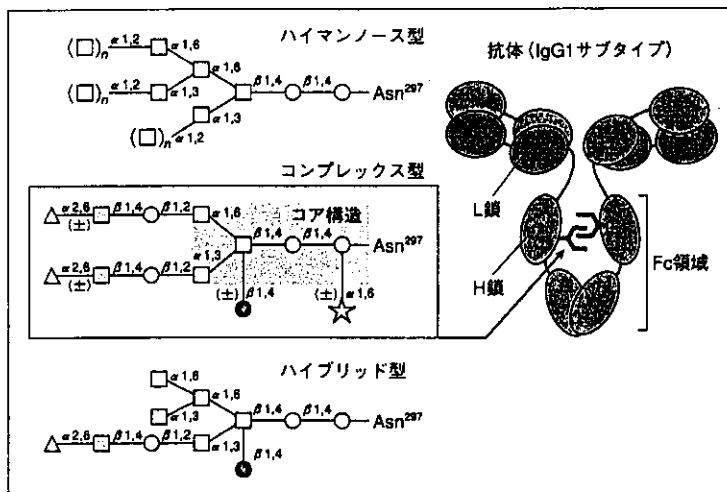


図17 抗体の糖鎖構造

N-グリコシド結合糖鎖には、ハイマンノース型、コンプレックス型、ハイブリッド型の3種類が存在するが、血液中IgGにはコンプレックス型糖鎖が付加されている。
○：N-アセチルグルコサミン、□：マンノース、●：ガラクトース、△：シアル酸、●：バイセクティングN-アセチルグルコサミン、☆：フコース 参考文献 23

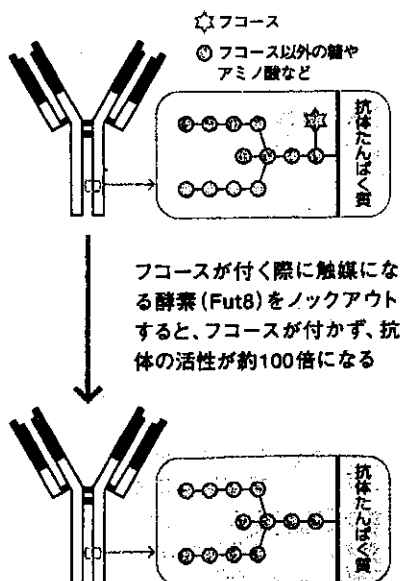


図18 フコースの低減技術 参考文献 14

λ) 遺伝子の発現が確認された。さらに、生まれたクローン仔ウシを詳細に調べた結果、λ HAC ベクターは8割以上のウシ体細胞（繊維芽細胞および末梢血リンパ球）に

において安定に維持され、末梢血リンパ球においては、多種多様なヒト抗体重鎖 (IgH)・λ軽鎖 (Igλ) 遺伝子が機能的な組換えを起こし、発現していることが明らかになった。さらに、ヒト抗体はタンパク質としてウシ血液中に分泌されていることがELISA（酵素免疫測定）法およびウエスタンブロット解析により証明された。

1.4 糖鎖改変抗体

協和発酵で開発され、バイオワ社のコア技術になるフコース低減技術である。医薬品として開発されている抗体のほとんどは約150kDaのIgG型であり、H鎖L鎖それぞれの二量体より構成され、Fc部分のC_H2領域にアパラギン結合型のコンプレックス型糖鎖を持つ糖タンパク質である（図17）。

抗体の糖鎖は共通のコア部分をもつが、末

表4 その他の抗体医薬品の製造技術 参考文献 41

システム	抗体の型	回収源
哺乳動物		
ヤギ	IgG	乳汁
ニワトリ	IgG	卵
植物		
タバコ	sIgA, IgG	葉
メイズ (トウモロコシ)	IgG	種子
大豆	IgG	さや, 種子, 幹, 葉
米	scFv	種子
小麦	scFv	種子

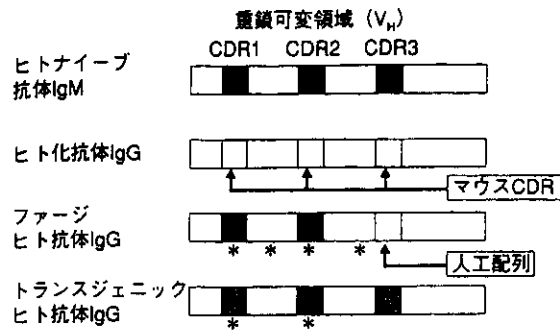


図19 HAHAの問題

ヒト由来のナイーブ抗体IgM重鎖可変領域 (V_H) とヒト化抗体、ファージディスプレイヒト抗体、トランスジェニックヒト抗体のV_H領域の比較模式的に点変異箇所(ポイントミューテーション)を*で示した。参考文献36

端の修飾が異なる 30 種類以上のオリゴ糖の混合物である。彼等はこの糖鎖の付け根に付いているフコースがなくなると後で詳述する抗体依存性細胞障害活性が動物レベルで 100 倍上昇することを見出した(図 18)。

この技術は CHO 細胞で抗体を生産する時に、糖鎖にフコースが結合するための触媒として必要な Fut8 という酵素遺伝子をノックアウトして発現させなくすることで、フコースのついてない抗体を作成するものである。

1.5 その他

ヤギや植物にヒト抗体を生産する技術、ニワトリの卵白中にヒト抗体を蓄積する技術なども開発されている(表 4)。

2 抗体医薬の特徴

2.1 キメラ抗体、ヒト化抗体

キメラ抗体、ヒト化抗体においてはマウス由来のアミノ酸配列の減少により、抗原性は著しく減弱し、実用的な抗体医薬の開発が可能となった。キメラ抗体、ヒト化抗体は現在開発中の抗体の約 50%強を占めている。しかしながら、依然抗原性の問題は残されている。キメラ抗体においてフレームワークを含む可変領域は、抗原性を残し

ており、多くの場合投与した患者の 3 割強に HACA (human anti-chimera antibody) が出現する。ヒト化抗体においても、キメラ抗体ほどではないにしろ場合によっては HAHA (human anti-human antibody) が患者に十数%の割合で出現する。この HAHA はマウス由来の CDR 配列に対するものであり、C 領域の多型性 (アロタイプ) や糖鎖によるものではない(図 19)。このような HACA 及び HAHA 反応が強くと起こると、投与された抗体医薬の効果が減弱されるばかりではなく、アナフィラキシーショックが起こる可能性がある。また、ヒト化抗体技術は、それぞれのマウスモノクローナル抗体に対して個別にデザインし、遺伝子組換え体を作成する必要があると共に、そのデザインによってはマウスモノクローナル抗体に比べて親和性が低下する場合がある。

2.2 ファージディスプレイヒト抗体

ファージディスプレイヒト抗体はヒト抗体の V 遺伝子をランダムに組み合わせて結合させ、それがそのまま in vitro での免疫系を再現するため、免疫学的な自己と非自己の選別過程を経ることがない。すなわち、いわゆる免疫学的に禁止クローンとよ