

20050110/B

厚生労働科学研究研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュトリーサイエンス総合研究事業

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

平成15—17年度 総合研究報告書

主任研究者 黒澤 良和

平成18（2006）年4月

## 目次

### I. 総合研究報告

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

黒澤良和----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 12

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----14

救急治療薬としてのヒト抗体調製に関する研究

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、献血による現在の輸血体制を補完する、もし可能ならば根本的に改めて、安全で保存可能な人工血液を開発する目的で、厚生労働省が補助する事業として平成9年度から実施されている。人工血液としては、人工赤血球、人工血小板、人工抗体が対象となっている。赤血球および血小板は、健康なヒト体内に存在するものの機能をなるべく完全な形で代替できる機能を持つものを人工的に作り出すことが目標となる。しかし、抗体は事情が異なる。健康な人は、病原菌や病原性ウイルスに感染し発症しても、やがて自分の体内で抗体を産生し治癒する。一方、癌やリウマチを対象疾患として、元来は体内で作らない特定の抗原に対する抗体を治療薬として単離開発することが製薬企業を中心として世界的に進められている。抗体の場合は、血液代替物というよりは治療薬として開発することが求められている。研究代表者の研究グループで対象としたのは、病原性ウイルス[水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、B型肝炎ウイルス、サイトメガロウイルス、SARSウイルス]、病原菌が分泌する毒素(ジフテリア毒素、破傷風毒素、ボツリヌス毒素)、ヘビ毒(ハブ毒)である。ここで対象としているウイルス性疾患及び病原菌毒素の多くは、ワクチン接種が実施されており、そのため健常人の多くは既に抗体を持っているか、また感染しても発症後治癒することから死亡の危険度が低いもの(SARS及びボツリヌスを除く)であるが、抵抗力の弱った人にとっては治療用ヒト抗体のニーズが高い疾患である。

本プロジェクトは既にIII期にわたって実施されている。第I期(平成9-11年度)には主任研究者のグループでヒト抗体ライブラリー(AIMS)を作製し、そのスクリーニング法の技術開発にほぼ全ての時間を費やした。第II期(平成12-14年度)になって5グループの共同研究者を得て、ジフテリア毒素、破傷風毒素(高橋元秀博士)、VZV(白木公康博士)、インフルエンザウイルス(奥野良信博士)、B型肝炎ウイルス

(千葉丈博士)、ハブ毒(野崎真敏博士)を対象に治療用抗体開発を実施した。主任研究者のグループが抗体単離を担当し、共同研究者のグループが抗原の調製と抗体の検定を担当する分業体制でプロジェクトを進めた。ファージディスプレイ法による抗体ライブラリー作製技術は、10年以上前(1989-1994年頃)に開発されたものだが、それぞれの抗体の使用目的に合致した性質の抗体を得るためには、抗体遺伝子のソースとして何を用いて抗体ライブラリーを作るべきかに始まり、ライブラリー作製法、ライブラリースクリーニング法等で未だ多くの解決すべき問題が残されていた。そこで、第II期は、このような問題の克服法を開発する時期でもあった。主任研究者のグループでは平成11-15年度に、文部科学省の科学技術振興調整費による「ポストゲノム時代のタンパク質機能解析ツールとしての抗体利用法の開発」プロジェクトも手掛けていたために抗体ライブラリーの長所と短所、更に問題点の克服法について多くを知るところとなった。具体的には、ジフテリア毒素に関して、現在用いられているウマ抗血清に代替可能な強い活性を示すヒトモノクローン抗体1種類を単離するのに成功した。VZVに対しても強い中和活性を示す2種類のヒトモノクローン抗体を取得した。更にハブ毒に対して中和抗体を得る試みの中で、特定のヒト(この場合、ハブ毒に対する強い中和抗体価を有するヒト)がボランティアとして成分献血(リンパ球を含む単核球画分)に協力してくれたために、そのヒトの*in vivo*抗体レパートリーを完全に反映した抗体を含むライブラリー作製が可能となる技術開発に成功した。これは、ハブ毒中和抗体に限らず、極めて一般性の高い方法の開発につながった。このような状況の中で、上記SARSウイルス、ボツリヌス毒素については、本プロジェクトとは別途に研究費の支援を受けることとなった。そこで、第III期にはインフルエンザウイルス及びハブ毒を対象とした研究班を組織して集中的に研究を進めることとした。主任研究者らが所属する大学は、文部科学省の21世紀COEプログラム(医学分野)で拠点校に指定されており、学内でも臨床医の支援を比較的受けやすい環境状況にあることも本プロジェクトを円滑に遂行し易い条件となっている。

インフルエンザの場合、ウイルスに感染して発病した例や、もしくはワクチン接種によってどのような抗体が体内で産生されるのか、モノクローン抗体レベルで解析された研究が事実上皆無である。更にウイルスを中和して抗体を単離調製すると、それは果たして予防薬や治療薬となり得るのかという根本問題がある。インフルエンザウイルスに対する中和抗体の研究が進められていないのは、このウイルス特有の性質に由来

する。20 世紀にインフルエンザは 3 度世界的大流行 (pandemic) を起こしている。スペイン風邪と呼ばれた 1918 年が第 1 回目で、この時には世界で約 4000 万人が死亡したと報告されている。第 2 回目が 1957 年のアジア風邪、第 3 回目が 1968 年の香港風邪である。インフルエンザウイルスはウイルス粒子の表面タンパク質であるヘマグルチニン (HA) とノイラミニダーゼ (NA) の型 (HA で 15 種類、NA で 9 種類) で大きく分類されるが、その全ての組合せのウイルスが感染可能で、しかも発病せずに共存する渡り鳥カモが絶対的な宿主となっているために、時折病原性を獲得してニワトリ等の家禽類に蔓延し、そののちヒトからヒトへ感染性を獲得し、pandemic を引き起こす。pandemic が起こる原因は、新型インフルエンザとして出現する時にヒトには前もって抵抗力 (そのウイルスを中和する能力を持った抗体) が存在しないことによる。インフルエンザウイルスが持つ爆発的な感染力 (発病まで短期間) のため、一過性の大流行が起こる。スペイン風邪は H1N1 型、アジア風邪は H2N2 型、香港風邪は H3N2 型ウイルスであり、現在 H5N1 型のトリインフルエンザが新たな pandemic を起こすと恐れられている。この pandemic 以外に毎年のように繰り返される epidemic と呼ばれるインフルエンザの流行がある。この場合は、ヒト体内に存在するウイルス中和抗体の pressure を受ける中で、ウイルスゲノム (とりわけ HA 遺伝子) に導入される突然変異によって HA のアミノ酸配列が変化を起こし、既存の中和抗体の影響を受けにくくなった変異体が新しく出現し選別されて流行を起こす antigenic-drift と呼ばれる現象に起因する。このため、製薬会社にとってインフルエンザウイルスに対する治療用抗体を開発しても、製品化した時には既にウイルスの抗原性が変化して有効性を失っていると予想されることがその開発意欲をそいでいる。つまり、インフルエンザウイルスに対して治療用抗体開発は方針足り得ないというのが一般常識である。

インフルエンザウイルスに対する中和抗体が認識する分子は HA である。ウイルス中和活性を示すマウスモノクローン抗体を多数単離し、その認識部位を解析することから、HA 上の 5 ヶ所の領域が中和エピトープとなることが示されている。antigenic-drift を起こして変異したウイルスのアミノ酸配列が既に多数決定されており、変異を起こしやすい部位が、上記 5 つの領域内に分布する傾向が認められている。それではヒト体内ではインフルエンザウイルスのどこを認識し、それは何種類存在するであろうか。本プロジェクトは第 III 期でこの疑問に答えることが最大の課題となった。更にヒト体内で産生される抗体は全て

antigenic-drift によりウイルスを中和できなくなってしまうのか。どのように antigenic-drift が起きようが変異できない部位があり、そのような部位に結合するウイルス中和抗体は存在し得ないのか、このような疑問に答えることが目的である。更に antigenic-drift はウイルス側の変異であるが、中和抗体から antigenic drift により中和されることを逃れたウイルスに対して抗体の遺伝子側に変異が導入されて再度中和活性を獲得し直すことはないのか。様々な疑問がわく。本研究では3名の小児科医の協力を得ることができた。具体的には1944年生、1964年生、1974年生の医師から3Lの血液に相当するリンパ球（それぞれ約 $10^9$ 個）を含む成分採血をし、それを出発材料に巨大な抗体ライブラリーを3組作製した。抗原としては1968年に始まり現在まで流行しているH3N2型インフルエンザウイルスを対象とした。この間使われたウイルス株を3-4年ごとに代表株として選択し、12株を用いた。そこで $3 \times 12 = 36$ 通りの組合せのスクリーニングを実施し、3名の体内に存在するであろう、全ての抗H3N2型ウイルス中和抗体単離を目指すこととした。抗体を単離したのちは、それぞれのクローンがどの株を中和できるか体系的に解析したのち、その代表的なクローンについては中和エピトープを決定することとした。本研究プロジェクトは現在も進行中であるが、様々な貴重なデータが揃いつつある。極めて大規模に行われており、この研究がもたらす情報はH5N1型トリインフルエンザ対策にも大きな影響を与えるであろう。

ウイルスの場合と異なり毒素をモノクローン抗体で完全に中和できるかは定かでない。中和抗体の結合したウイルスは感染力を失う。そこで病原性ウイルスが感染して発病した患者の体内ではウイルスの増殖—伝播と中和抗体が激しい戦いを繰り広げていることになる。中和抗体が出現すると急速にウイルス粒子数が減少する結果を生む。この選択システムが機能して中和抗体を産生するリンパ細胞は選択的に残る。興味あることに今までに単離したインフルエンザに対する抗HA抗体は殆ど全て単独でウイルス中和活性を示した。一方、毒素の場合中和という現象を考えると、状況は単純でない。病原菌が分泌する毒素（ジフテリア毒素、破傷風毒素、ボツリヌス毒素）は細胞上の特定のレセプター分子に結合し、細胞内部へ取り込まれ、細胞内の特定分子の機能を阻害して細胞死をもたらす。毒素は、分子を構成する幾つかのドメインにこの一連の機能を分担させている。そこでウマ血清を用いる治療法は、その全ての機能に対してそれぞれ阻害効果を示す抗体が含まれたポリクローン抗体の状態で成立している。抗体ライブラリーをスクリーニングする

と強い結合力 (Kd 値が 0.1-1nM) を示す抗体が数多く得られるが、ジフテリア毒素に対してその中の 1 クローンが単独で毒素のレセプターへの結合プロセスを阻害し、その中和力の強さはウマ抗血清に匹敵する程度に高い例が見つかった。しかし破傷風毒素やボツリヌス毒素では単独で強い中和力を示すクローンは見つかっていない。

へビ毒の場合、状況は更に複雑である。毒を構成するのは多因子である。ハブ毒の場合、最も量が多い出血因子 HR1 と HR2 を対象にしている。両方ともプロテアーゼであり、血管壁の一部である基底膜（細胞外マトリックス）の構成タンパク質を分解して出血させる。本研究ではハブ毒に対する強い中和抗体価を有するヒトのリンパ球から抗体ライブラリーを作製した。そこでそのライブラリーの中和抗体によって HR1 と HR2 の機能を阻害できるはずである。HR1 と HR2 に結合する多数の抗体を得た後、個々のクローンの中和活性を調べた。HR1 ではモノクローンレベルでウマ抗血清に強い中和効果を示す抗体が得られた。一方、HR2 では集団の状態では強い中和活性が見られるが、モノクローン抗体にすると中和力が失われる。一体 HR2 のどこを認識する何種類の抗体が中和に必要なか、今後明らかにする必要がある。そのことを通して治療用ヒト抗体を具体的に調製することが可能なのかを結論づける予定である。

分担研究者

奥野良信・大阪府立公衆衛生研究所・副所長  
盛根信也・沖縄衛生環境研究所・研究員

#### A. 研究目的

本プロジェクトは、平成 9 年度高度先端医療研究事業の「人工血液」に関する研究として開始された。具体的には、各種疾患に対する治療薬としてのヒト抗体単離調製技術を開発し、病原性ウイルス感染による疾患、病原菌が感染し、その分泌する毒素により発症する疾患、へビに咬まれてその毒素の影響による疾患に対してそれぞれ治療に役立つヒト抗体を単離調製することを目標とした。プロジェクトは III 期にわたって進められた。第 I 期（平成 9-11 年度）は、数 10 名分の扁桃、臍

帯血、骨髄、末梢血を材料にファージディスプレイ系を用いて抗体ライブラリー (AIMS) を作製し、それを用いて様々な抗原に対するスクリーニングを実施した。結果的に、ファージ抗体ライブラリーから使用目的（この場合は治療に役立つ）に合致した性質を有する抗体を効率的に単離するには様々なノウハウが必要であることがわかり、第 I 期は全期間を通して悪戦苦闘の日々であった。第 II 期（平成 12-14 年度）には 5 グループの共同研究者を得て、対象疾患を具体的に想定して治療用ヒト抗体単離を行った。第 II 期の成果については平成 12-14 年度の総合研究報告書に詳しく記述したが、要旨をまとめると、（結論 1）ヒト体内にある特定の性質を示す抗体を確実にモノクローン抗体として単離調製する技術

を習得した。(結論2) ヒト体内で抗原による免疫を受け、その結果その抗原に結合する成熟した抗体は、我々が採用した戦略(3L血液相当の成分採血—巨大ライブラリーの構築)に基づく抗体ライブラリーの中に必ず入りおりクローン化できる。(結論3) 抗体ライブラリーが持つナイーブレパートリーのサイズは、*in vivo* の抗体レパートリーサイズと大差ない。このことは、一方において抗原がナイーブである限りは、抗体ライブラリーの大きさを巨大にしても、そのことは抗原結合力の高いクローンが必ず含まれるようになることへの保証となっていないことを意味する。(結論4) *in vivo* での抗原による免疫—成熟した抗体を産生する細胞が利用できる限り、その抗体をコードする遺伝子単離を目指すのが正しい方針である。(結論5) AIMS ライブラリーは、ナイーブ抗原に対する抗体単離には適さず、逆に価値ある抗原—抗体の組合せ(例えば癌特異抗原)を探すのに用いると真の威力を発揮する。以上の結論は、3年前に得たものであるが今もそのまま通用する。唯一の例外は、結論3 に関してナイーブ抗原に対してもライブラリーのスクリーニング法を工夫すれば、Kd 値で0.1-1nM という強い結合力を示す抗体クローンが得られる例が存在することが変更点である。第 III 期になって、以上の結論に基づき、ハブ毒に対する強い中和抗体価を有するヒトから作製した抗体ライブラリーを用いて、ハブ毒成分に対する治療用抗体の単離調製、更に3名の小児科医の成分血から作製した抗体ライブラリーを3組作製し、その中にインフルエンザウイルスに対してどのような中和抗体を含むか解析することを研究目標に掲げた。

## B. 研究方法

### ヒトモノクローン抗体作製法

平成15年度総括分担研究報告書の中で、我々が用いているヒトモノクローン抗体作製法について3種類記述した。具体的に第3の方法として、対象抗原を蛍光色素で標識し、その抗原に結合する抗体産生細胞を同定、分離(—細胞レベル)した後、ゲノムDNAから直接抗体遺伝子を単離する。更に大腸菌でその抗体遺伝子を発現して抗原結合能を確認する方法である。この方法については特許申請も行い、その後、幾つかの抗原に対して本スクリーニング法を用いて抗体単離を行った。しかしこの方法で得られる抗体の中に強い結合力を示すものが含まれていなかった。この実験結果を検討する中で、免疫容量(個体の中に抗体産生細胞が何個存在するか)と、その中の一体どの程度の細胞を対象として解析したことになるのかが問題となった。この方法では多く見積もっても $10^6$ - $10^7$ しか対象としていない。一方で、ヒトの*in vivo*抗体レパートリーを忠実に反映した抗体ライブラリー作製に、ファージディスプレイ系が非常に適しているという感を強めている。今までに既に幾つものディスプレイ系が開発されている。イーストディスプレイ系、大腸菌ディスプレイ系、リボソームディスプレイ系等である。イーストディスプレイ系は、二次元セルソーターと組合せることにより、抗体遺伝子に変異を導入して抗原結合力が高まったクローンを得るのに巧みに利用されている。イーストディスプレイでは、 $10^8$ 程度の独立したクローン数を扱うのが限界だが、変異を導入したクローン数として、導入部位を工夫すればそのオーダーで充分である。リボソームディスプレイ系の場合は、クローン化の段階を経ないために



理論的には溶液中に存在する mRNA の分子数に匹敵する多種多様な分子集団を対象にできる。しかし、抗原抗体反応が平衡反応であることに基づく限界があり、抗原抗体複合体として回収できるかどうかについて様々な制約がかかっている。ヒト体内に存在する抗体の種類は  $10^8$ - $10^{10}$  の範囲内にある。ここで免疫系の容量（具体的には 1 固体内の B リンパ球の総数）が重要な要素をしめる。独立に分化した B リンパ球で発現している抗体 H 鎖は、DNA 塩基配列で見ると事実上全て異なる。そこでヒト B リンパ球総数を  $10^{11}$ - $10^{12}$  として H 鎖配列の多様性は  $10^9$  程度と推定できる。L 鎖の多様性は実質的に数百種類程度である。そこで成分採血により  $10^9$  程度の B リンパ球を得る。そこから  $10^9$  の独立したクローンからなる H 鎖ライブラリーをつくり、(H+L)ライブラリーとしては  $10^{11}$  の独立したクローンからなるライブラリーを作ることが重要となる。H 鎖と L 鎖を別々に増幅してライブラリー化した後、ランダムに組合せることに対して *in vivo* の組合せを反映しないという批判がある。しかし、VHDJH、VLJL という DNA 再編成を通して作られる抗体のナイーブレパートリー自身がランダムな組合せの産物である。成熟した抗体の場合は、その抗体産生細胞の数が相対的に多い。そこでその抗体をコードする H 鎖および L 鎖遺伝子が両方とも数が多いために、作製した抗体ライブラリーの中に目的とする抗体が必ず含まれていることになる。

#### 抗体ライブラリースクリーニング法

精製抗原が利用可能な場合に、通常パニング法が使われる。プラスチックチューブ（もしくはウェル）に抗原を付着させる。その後、抗体を発現したファージ粒子集団を混ぜて抗原抗体複合体を形成させる。洗浄してフリー

ファージ粒子を除いた後、複合体を形成したファージ粒子を回収する。ファージディスプレイを用いた抗体ライブラリーから抗体を単離した場合に、抗原に結合する抗体はほぼ確実に得られる。問題は、その抗原の性状と目的とする性質をした抗体のライブラリー中での存在量にかかっている。ナイーブ抗原の場合、更にその抗原が少しナチュラルな立体構造からズレている場合に、ナチュラルな分子に強く結合する抗体はまず得られない。しかし本プロジェクトで実施しているハブ毒とインフルエンザウイルスの場合は、作製した抗体ライブラリーの中にナチュラルな抗原に対して成熟した（抗原結合力を増した）抗体が多数含まれていることが期待できた。そこで本研究ではパニング法でスクリーニングを行った。本プロジェクトとは別に、例えば生きた細胞膜上に存在する全ての分子に対して特異的に結合する抗体の単離法を、我々は開発することに成功している。

#### ハブ毒に対して

ハブ毒成分として出血因子 HR1、HR2 更に phospholipase A2 と [TABE]-esterase を精製して抗原として用いた。

#### インフルエンザウイルスに対して

1968 年から 2004 年にかけてワクチン株として用いられた 12 種類の H3N2 型のウイルス粒子を精製後ホルマリン処理することにより不活化して、それを抗原として用いた。

#### (倫理面への配慮)

本研究で用いている抗体ライブラリー作製の方法として用いたリンパ球を提供した 4 名は、本研究の意義を熟知しており、本人の承諾及

び大学の倫理委員会の許可を受けた上で成分採血を実施した。

### C. 研究結果

#### ハブ毒中和抗体について

出血因子 HR1 に対しては、HR1 分子に結合する 10 数種類のモノクローン抗体を単離し、その中の一種類が HR1 の作用を強く阻害する活性を示した。このクローン(HR1-007)は IgG 型ヒト抗体として調製され、ウマ抗血清に匹敵する強い HR1 中和活性が確認された。出血因子 HR2 に対しては、HR2 分子に結合する抗体を数 10 種類単離したが、いずれも単独で HR2 の作用を阻害する活性が認められなかった。しかし、パニング法によるスクリーニングを 4 回繰り返した後の回収画分に含まれる抗体集団をポリクローンの状態のまま活性測定すると、強い中和活性が認められた。このことは HR2 中和には複数の抗体が共存して初めて毒素を中和できる可能性を示唆している。最終的にヒト抗体を治療薬として用いることを考えれば、なるべく少数であることが必須となるために、HR2 について中和に必要な抗体の組合せの検討が必要となる。

#### インフルエンザウイルスについて

第 II 期に於いて、AIMS ライブラリーを抗体ソースとして数種類の抗原に対するスクリーニングを繰り返し、5 種類のインフルエンザウイルス中和抗体を得ることができた。その際は、単離した数百種類の抗体の殆ど全てが NP (核タンパク) に結合するものであり、いかにして NP でなく HA (ヘマグルチニン) に結合する抗体を得るかが課題であった。HA に結合する抗体は全て強いウイルス中和活性を示した。第 III 期になって 3 名の小児科の成分血を材

料として作製した抗体ライブラリーを用いることにより状況は一変した。3 組のライブラリーの中でやはり NP に対する抗体が多数単離されるものもあるが、抗原画分から NP を除く技術開発を行ったことも手伝って、既に 7,390 個のクローンを単離し、その中に 317 種類の HA に結合するクローンが含まれており、事実上ほとんど全てのクローンがウイルス中和活性を示した。それぞれのクローンについて 1968 年から 2004 年に至る 12 種類のワクチン株のどれを中和できるか体系的に解析している。本研究は進行中であり、なるべく早急に結果を論文として発表する。1968 年から 2004 年まで全ての株を中和できる特異性の広い抗体から、2003 年の株は中和するがその前後 (1999 年と 2004 年)の株は中和できない特異性の狭い抗体まで、様々な特異性を示すクローンが含まれている。いずれにしても本研究は 3 名の小児科医の体内に存在する抗 H3N2 型インフルエンザ中和抗体の *in vivo* レポートリーの全体像を明らかにすることとなる。更に、それぞれの抗体が認識するエピトープを決定し、変異しにくい中和エピトープに対する抗体を治療薬として開発する予定である。

### D. 考察

本プロジェクトを 9 年間継続して実施して得た最大の成果は、抗体が予防または治療に役立つ疾患であるなら治療用ヒト抗体を単離調製できることを具体的に示したことである。更に現在行っているインフルエンザウイルスに対する抗体の解析で示したように、感染一発病後、治癒過程でどのような抗体がヒト体内に産生されているか、同じ事はワクチン接種によりどのような性質の抗体産生を誘導できるかもモノクローン抗体レベルで解析可能

になった。今後、単離調製した抗体を上市するまでには、(1)いかなるアッセイ系を用いた動物実験を行うことにより薬効を示せるか、(2)如何にして臨床試験を実施するか、(3)その費用をだれが負担するか等の現実的には深刻な問題が残されている。その際は市場規模とか費用対効果等も含めて議論することになるが、ここではそのことは問題にしないで対象ごとに考察を加える。

#### ウイルス性疾患に対して

ウイルスに感染—発病した後、治癒過程で体内に出現するウイルス中和抗体は、治療薬としても最も有効に機能する抗体と期待できる。インフルエンザウイルスのHAに結合する抗体が全てウイルス中和能を示していることは、それらが生体内で選択されたクローンに相当することを示唆しており、その典型例であろう。一方、ワクチン接種により産生誘導される抗体のうちどの程度がウイルス中和力を示すか、今後検討の余地がある。何故ならば、体内で抗体が産生され始めた後、生きていないウイルスが抗原となっている状況では、中和力の有無が抗体産生細胞の生死を選別する条件として有効に機能しないと予想されるからである。いずれにしろ、VZV、麻疹(Measles)、おたふく風邪(Mumps)、サイトメガロウイルス、狂犬病(Rabies)、等に対しては強い中和活性を示すヒト抗体を得ることは可能であり(一部終了している)、単独のモノクローン抗体で充分高い治療効果を期待できる。

インフルエンザウイルスに対しては、現在大規模な解析を実施中で、「antigenic driftの影響を受けにくい中和エピトープに対する抗体を治療薬とする」考えが有効であるか、

いずれ明らかとなる。緊急の課題としてH5N1型トリインフルエンザが変異を起こしてヒトからヒトへ感染する新型インフルエンザとなった際の対策として、それを中和する抗体を前もって準備できるかどうかが問題となっている。近い将来とはいっても未来に起こることを予測した上で、その結果として出現するウイルスを中和するという話である。このことについては、ウイルス粒子上の中和エピトープの解析をヒトモノクローン抗体を用いて詳細に解析する必要がある。明らかにマウス免疫系とヒト免疫系では免疫容量が1000倍異なる。その上でトリインフルエンザウイルスにどのような変異が起これば新型ウイルスになるのか予測可能となっているので、準備すべき中和抗体に求められる性質もある程度限られたものとなる。

#### 病原菌が分泌する毒素

ジフテリア毒素については、単一のモノクローン抗体でウマ抗血清に匹敵する強い中和活性を示す抗体が得られた。破傷風毒素とボツリヌス毒素については、複数の抗体が毒素完全中和に必要なようである。臨床試験を実施する場合、複数の抗体を用いるのは容易なことでは実現できない。体内に入った毒素が機能するまでのどの段階をどのように阻害する必要があるから複数の抗体の関与が必須といった詳細な解析が必要となる。

#### へび毒

ハブ毒に関して出血因子HR1とHR2では異なる結果がでた。HR1に対しては単独のモノクローン抗体で中和可能でHR2では複数必要である。このことについても分子レベルでの解析が必要となる。

以上のように本プロジェクトは、一部の疾患については中和抗体の単離調製のレベルを終了し、如何にして上市まで持ち込むか、そのプロセスを構築し実現する段階に入った。今後 IV 期（もし実施されるとしたら）では、このことを最大の課題として実施する。

#### E. 結論

本プロジェクトは病原性ウイルス、病原菌が分泌する毒素、ヘビ毒に対して中和能力のあるヒトモノクローン抗体を単離調製し、治療薬として開発するプロセスを組み立て、幾つかの対象疾患に関しては実現することを目標としている。第 III 期（平成 15-17 年度）では、ハブ毒およびインフルエンザウイルスを対象とした。

#### ハブ毒について

出血因子 HR1、HR2 を標的抗原とした。HR1 に対してはウマ抗血清に匹敵するほどの強い中和活性を示すモノクローン抗体が得られた。一方、HR2 に対しては複数の抗体が共存することで初めて毒素中和能力が発揮されるらしいことが示された。

#### インフルエンザウイルスに対して

1968 年に始まり今でも流行している H3N2 型インフルエンザに対して、日頃から患者と接することにより heavily immunized の状態にあるウイルス中和抗体レパトリーの全体像を明らかにする作業を続けている。それぞれの臨床医の体内には 200 種類を超える抗 HA 抗体（ウイルス中和活性を示す）が存在し、それぞれの抗体の特異性は狭いものから広いものまで様々な性質を示す。今後、その全体像を明らかにする中で、治療薬開発の可能性、

ワクチン接種により産生誘導される抗体の中和力の有無等、様々な問いに対する解答が得られるであろう。

#### F. 研究発表

##### I. 論文発表

1. 黒澤良和: 抗体遺伝子群の進化—ラクダ H 鎖単独抗体系の出現. ゲノムからみた生物の多様性と進化 (五條堀孝 編) pp157-163(2003) Springer.
2. 松井英男、高橋孝行、赤堀泰、他: スキルス胃癌:細胞外マトリックスを標的とした新しい治療は可能か 外科治療 39, 310-306 (2003) 永井書店.
3. 黒澤良和: 新規抗体療法の開発 血液・免疫・腫瘍 3(3), 231-235 (2003) メディカルレビュー社.
4. 黒澤良和: 抗体をツールとした創薬および抗体創薬の戦略 Drug delivery system 18(6), 528-535, The Japan Society of Drug Delivery System (2003).
5. K.Higo-Moriguchi, Y.Akahori, Y.Iba, et al.: Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing rotaviruses. *J. Virol.* 78, 3325-3332 (2004).
6. A.Ideno, M.Furutani, T.Iwabuchi, et al.: Expression of foreign proteins in Escherichia coli by fusing with an archaeal F506 binding protein. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 99-105 (2004).
7. S.Hidaka, Y.Akahori, & Y. Kurosawa: Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 17, 10553-10567 (2004).
8. 黒澤良和: ファージ抗体ライブラリーの利用 Medical Science Digest 30(3), 528-529 (2004).

9. M. Sato, R. Iwaya, K. Ogihara, et al.: Intrabodies against the EVH1 domain of Wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells. *FEBS J.* 272, 6131-6144 (2005).
  10. 黒澤良和 血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発 人工血液 13, 13-21 (2005).
  11. G. Kurosawa, N. Takamatsu, M. Takahashi, et al. Organization and structure of hox gene loci in medaka genome and comparison with those of pufferfish and zebrafish genomes. *Gene* 370, 75-82 (2006).
  12. M. Kakita, T. Takahashi, T. Komiya, et al. Isolation of A Human Monoclonal Antibody with Neutralizing Activity against Diphtheria Toxin. *Infect. Immun.* (in press).
- II. 学会発表
1. 黒澤良和 「感染症および癌治療薬としてのヒト抗体」人工血液を作る(6)、 於：日本科学未来館、平成 18 年 2 月 11 日
  2. Y. Kurosawa. What can we do? Rationale for our antibody technology. The third international workshop of Fujita Health University 21st century COE. “Can monoclonal antibodies regulate flu?” Nagoya, Feb. 24-25, 2006.
  3. J. Okada. How many kinds and what kinds of antibodies that neutralize H3N2 type of influenza virus are present in the human body? The third international workshop of Fujita Health University 21st century COE. “Can monoclonal antibodies regulate flu?” Nagoya, Feb. 24-25, 2006.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
    1. 抗体作製方法  
特願 PCT/JP2004/004113、  
平成 16 年 3 月 24 日出願
    2. 無細胞タンパク質合成系を利用したタンパク質の製造方法  
特願 2003-406333、  
平成 15 年 12 月 4 日出願
    3. 細胞表面抗原に対する抗体取得とその抗原同定  
特願 2004-349783、  
平成 16 年 12 月 2 日出願
    4. 抗 IGSF4 抗体及びその利用  
特願 2005-54624  
平成 17 年 2 月 28 日出願

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
黒澤良和	新規抗体療法の開発	血液・免疫・腫瘍	8	231-235	2003
黒澤良和	抗体をツールとした創薬 および抗体創薬の戦略	Drug Delivery System	18(6)	528-535	2003
K.Higo-Mori guchi., et al.	Isolation of human monoclonal antibodies neutralizing rotaviruses	J. Virol.	78	3325-3332	2004
A.Ideno., et al	Expression of foreign proteins in Escherichia coli by fusing with an archaeal F506 binding protein.	Appl. Microbiol. Biotechnol.	64	99-105	2004
S.Hidaka, et al.	Dendrodendritic electrical synapses between mammalian retinal ganglion cells.	J. Neurosci.	17	10553-105 67	2004
M.Sato, et al.	Intrabodies against the EVH1 domain of Wiskott-Aldrich syndrome protein inhibit T cell receptor signaling in transgenic mice T cells	FEBS J	272	6131-6144	2005
黒澤良和	血液代替物としての治療 用ヒト抗体の開発	人工血液	13	13-21	2005
M.Kakita, T.Takahashi, T. Koyama, et al.	Isolation of A Human Monoclonal Antibody with Neutralizing Activity against Diphtheria Toxin	Infect. Immun.	in press		2006
S. Okamoto, et al	Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of <i>Streptococcus pyogenes</i> infection in mice.	J. Virol	77	4104-4112	2003
N.Nakagawa , et al.	Neutralizing epitopes specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the "Loop"	J. Gen. Virol.	84	769 -773	2003
奥野良信	インフルエンザの検査と ワクチン	臨床病理	51(3)	268-273	2003
奥野良信	インフルエンザの治療:ア マンタジン	総合臨床	52(10)	2797- 2801	2003
奥野良信	次のパンデミックの予測 とその対策	大阪保険医雑誌	442	9-13	2003
奥野良信	インフルエンザの歴史と 展望	治療	85	3139- 3144	2003
奥野良信	インフルエンザ 感染症診 療・投薬ガイド	総合臨床		160-166	2003
N. Nakagawa,	Influenza B virus victoria group with a new	J. Clin. Microbiol.	42	3295 -3297	2004

et al.	glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season.				
S. Okamoto, et al.	Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza <i>Streptococcus pyogenes</i> superinfection	Vaccine	22	2887-2893	2004
T. Kumagai, et al.	Poor immune responses to influenza vaccination in infants	Vaccine	22	3404-3410	2004
S. Okamoto, et al.	The <i>Streptococcus pyogenes</i> capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal bacteria-viral superinfection	Infect Immunol.	72	6068-6075	2004
奥野良信	インフルエンザの疫学、サーベイランス	最新医学	59	42-47	2004
N. Nakagawa, et al.	Variation of the conserved neutralizing epitope in influenza B virus Victoria group isolated in Japan.	J. Clin. Microbiol.	43	4212-4214	2005
T. Kase, et al.	Isolation of influenza virus type AH3 from a traveler returning from Vietnam in July 2005 in Osaka, Japan.	JJID	58(6)	395-396	2005
奥野良信	世界のインフルエンザ 何が変わってきたのか	総合臨床	54(2)	234-238	2005
奥野良信	インフルエンザウイルスについて	チャイルドヘルス	8 (11)	4-6	2005
高橋和郎、奥野良信	インフルエンザワクチンの効果と新しいワクチン	医薬ジャーナル	41 (12)	124-128	2005
高橋和郎、他	A 型、B 型の鑑別が可能なインフルエンザ迅速診断キット改良型「ボクテムインフルエンザ A/B」の評価	Systemex Journal Web	6(3)	1-11	2005

# 抗体をツールとした創薬および抗体創薬の戦略

特集 プロテオーム創薬と DDS

黒澤良和\*

*Strategies for development of medicine using antibodies as tools and of therapeutic antibodies*

Antibodies can specifically bind to various antigens and form a large repertoire. If we well understand the characteristics of antibodies and utilize them as tools, we can obtain various informations which will be useful for development of medicine. Furthermore, since antibodies themselves are powerful self-defense molecules, we can directly develop human therapeutic antibodies against various diseases. In this review, I describe what should be considered and what kinds of problems should be solved to reach the above goals, based on the experiences of our "antibody project".

抗体は、さまざまな形をした分子に特異的に結合できる巨大レパートリーを形成した分子群である。その性質を正しく理解しツールとして利用すれば、創薬に結びつくさまざまな情報を入手できる。一方、抗体自身は生体防御分子であり、最近の組換え DNA 技術の発展からヒト抗体調製も可能になった。本稿では、抗体を利用するうえでなにを考え、どのような問題点を克服すべきか、筆者のグループが実施している“抗体プロジェクト”の理論的背景を概説する。

Yoshikazu Kurosawa\*

*key words : antibody, phage-display system, library of antibodies, therapeutic antibodies, tumour-specific antigens*

現在、巨大製薬企業にとっても新薬開発が非常に困難な時代にさしかかったといわれている。ゲノムサイエンスの展開から得られる膨大な情報から治療薬の標的を探す試みに期待が集まるわけである。しかし、多すぎる情報のなかから真に役立つ情報のみを取り出し、最小限の労力と最短時間を使って、新薬開発に至るソフトウェアの開発(アルゴリズムの発見)に成功したグループが出現したという話は聞こえてこない。一方、ハーセプチンやリツキシマンに代表される抗体治療薬の華々しい登場は、これからはしばらくの間、巨大製薬企業を含めた多くのグループによる抗体創薬が試みられ、そして多くの成功例が得られるであろうことを予想させる。

筆者は、藤田保健衛生大学という地方の私立大学で10数名からなる小さな研究グループを組織して“抗体プロジェクト”を展開している。このプロジェクトは、大きく二つの目標を掲げて展開している。“ポストシーケンス時代におけるゲノムサイエン

スの蛋白質機能解析ツールとして、抗体を用いる技術開発”および“さまざまな疾患に役立つ治療薬としてのヒト抗体の単離調製”である。

本稿では、筆者らのグループがここ数年にわたって実施している“抗体プロジェクト”を支える考え方、研究戦略を述べたい。

## なぜ“抗体”か

抗体は、脊椎動物(系統樹で軟骨魚以降)が持つ最も有能な生体防御分子である。H鎖とL鎖からなり、それぞれのN末端に位置する約110アミノ酸残基からなる変異(V)ドメインが抗原結合部位を構成する。この2個のVドメインが示すさまざまな分子を特異的に識別する、換言すると、さまざまな分子と選択的に結合できる能力が、抗体分子が持つ最も重要な性質である。現在、RNAに関してはPCR法を、さらにオリゴペプチド鎖については、いくつかのディスプレイ系を利用して、さまざまな分子と選択的に結合する配列(アプタマー)の探索が実施されて

\* Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University 藤田保健衛生大学総合医科学研究所



いる<sup>1,2)</sup>。しかし筆者らは、本稿で示す抗体ライブラリーの使用経験に基づき、さまざまな分子に対して結合する分子群として、網羅的かつ体系的に巨大レパートリーを形成しうるのは、抗体分子であり、それ以上の性能を示す分子形態を見いださうとは考えにくいという印象を持っている。

分子A(抗体)が分子X(抗原)と強い結合力を持って特異的に結合するには、さまざまな物理化学的条件が満たされる必要がある。

1. 分子Aは、しっかりした(熱力学的に安定な)一定の立体構造を持つ必要がある。分子Aが柔軟にさまざまな立体構造をとり、そのうちの一つの形をとった場合に分子Xと結合するような例では、複合体形成によりエントロピーの減少をもたらすことから強い結合力を持ちにくい。
2. 分子Aと分子Xが強固な複合体を形成するには、結合面における立体的相補性が存在し、そこで生じる水素結合、ファンデルワールス力、疎水結合、クーロン力が $K_A$ 値として $10^9 \sim 10^{10} M^{-1}$ をつくり出す必要がある。その場合、熱力学的法則である $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ に従って、 $\Delta G$ として大きな負の値を示す場合に、 $\Delta G = -RT \ln K_A$ の関係にある $K_A$ 値が十分大きな値として得られる。複合体形成において、エンタルピー項( $\Delta H$ )による結合力の獲得と、エントロピー項( $\Delta S$ )による結合力の獲得は相反する性質を示す<sup>3)</sup>。
3. ほとんどの場合に、分子Aと分子Xの複合体形成反応は、水溶液中で行われるために、水分子の影響がきわめて重要である。水分子の存在は、1個の水素結合により獲得される自由エネルギーを常に小さくする。
4. 分子Aは分子X群のさまざまな形に対応できるように、巨大なレパートリーを持つ分子群でなくてはならない。

筆者にとって、長年にわたる抗体および抗体遺伝子の研究に引きつづいて実施している抗体ライブラリーの研究から、いまさらのように抗体は見事にこの条件すべてを満たす分子であることを実感している。ここではつぎの3点を指摘したい。

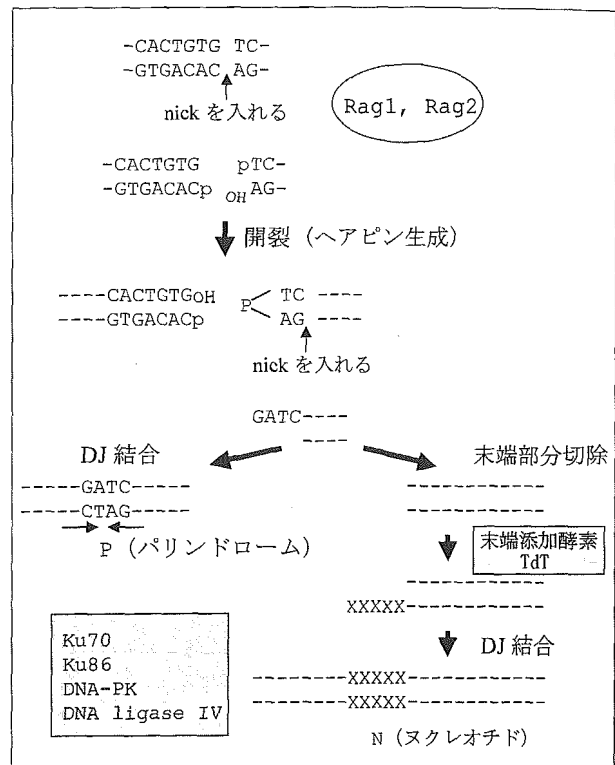


図1 抗体遺伝子座におけるV-D-J DNA再編成の模式図  
D遺伝子とJ遺伝子の間につくられるD-J結合を例に示す。最も大きな多様性が作り出されるのは、TdTによるランダム配列の挿入である。

1. 1個体中での抗体レパートリーの大きさ(パルトープの総数)は、いくら巨大であるといってもBリンパ球の総数を超えることはありえない。抗体遺伝子座におけるDNA再編成は図1に示す過程を経て進行するが、ここでアミノ酸配列の多様性増大に最も大きく貢献するのは、末端添加酵素(TdT)がランダム配列を挿入する段階である。T細胞レセプター遺伝子系では、 $\alpha$ 鎖 $\beta$ 鎖両方でこのTdTの関与がみられるが、抗体ではTdTはH鎖のみに関与し、L鎖の多様性増大には関与しない。一般的にいえば、ランダムヌクレオチド配列をつくることは当然ランダムアミノ酸配列を生み出し、結果として生じるペプチド鎖が上記にあげた条件1を満たす例はまれである。抗体の場合、H鎖のVDJ DNA再編成を起こしたのち、H鎖がポリペプチド鎖として発現されて、代替L鎖との(VpreBおよび $\lambda 5$ )との会合を通して、H鎖が正しくfold-

ingし抗原結合部位を形成するかチェックする段階が入る<sup>4)</sup>。ランダム配列の挿入は、多様性の増大という点ではきわめて大きなメリットを抗体に与えるが、立体構造的にみて多くの役に立たないH鎖を生じるという効率のわるいデメリットを与える結果を生み、つくったH鎖を取捨選択する機構としてこのステップを導入することにより、はじめて有効な抗体レパートリーをつくり出すことに成功している。このような機構を人工的につくるのは非常に困難な課題である。

2. 抗体は、H鎖における3種のDNA断片V<sub>H</sub>、D、J<sub>H</sub>遺伝子間の再編成、L鎖における2種のDNA断片V<sub>L</sub>、J<sub>L</sub>遺伝子の結合でつくられた一組の成熟型V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>遺伝子によりコードされる。それぞれの生物種が進化過程でこの断片化された5種の遺伝子群をどのように多様化、そして結果として出来上がった多様な配列を積極的に選択してきたかについて考えてみる。実験的には1個のヒトV<sub>H</sub>遺伝子のみを持つトランスジェニックマウスで、十分多様な抗体をつくれることが証明されている<sup>5)</sup>。この場合、ほとんどの多様性をTdTの関与のステップでつくり出している。以前からマウスではD遺伝子に多様性が少なく、ヒトのD遺伝子として多種多様な配列が存在することはわかっていた<sup>6,7)</sup>。マウスはBリンパ球総数が1個体あたり10<sup>8</sup>オーダーであり、多様なD遺伝子を有していても、それがつくり出す多様性を1個体では利用しきれない。

最近、筆者のグループで単離した数百種類のヒト抗体に関して、ヒト抗体H鎖CDR3(D遺伝子近傍がつくり出す部位)の-NDN-(NはTdTによる産物)配列を詳細に解析した<sup>8)</sup>。一見するときわめてランダムに見える配列だが、どの程度もともとのゲノムにコードされたD遺伝子配列由来であるか調べると、約50%がそれに相当する。換言すれば、ヒトのD遺伝子(総数25)は、実際に存在する抗体のなかで十分に使われている。こ

の例に代表されるように、生殖細胞ゲノム上に存在する多数のV<sub>H</sub>、D、J<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、J<sub>L</sub>遺伝子群は、進化過程で十分に役立つセットとして選別を受けていると推定できる。ちなみに、マウスのH鎖CDR3は、ヒトより少し短く、多くが中心部分にチロシン-チロシン-グリシン配列を持ち、その両側にランダム配列が配置された構造をしている例が多い。

3. 第三の点は、抗体の抗原結合力を高めるために使われている体細胞突然変異機構に関してである。体内でつくられる抗体は、抗原によるチャレンジ(体内への異物の複数回の侵入)によりその抗原に対する結合力を大幅に増す。これは抗体遺伝子座への変異の導入と特定の抗体産生細胞(抗体結合力を増加した抗体を産生する細胞)の選別がカップルして起こることによってはじめて可能になる<sup>9)</sup>。試験管内でこのことを再現することは容易ではない。単離した遺伝子にさまざまな手段で変異を導入することは可能だが、ランダムな位置への多数の変異の導入は、せっかく結合力を高める変異を導入しても、それを打ち消す変異をさらに導入する結果を生む頻度がきわめて高いと予想される。変異の導入の効果を個別に識別して、+の例のみを選択的に残すシステムが必要である。

以上の3例に示されるように、抗体系はさまざまな分子(抗原)と高い結合力で選択的に結合する分子(抗体)を生み出すシステムとして、実に合理的につくられている。ランダムなペプチド集団を例として比較すれば、たとえば、15アミノ酸残基からなるオリゴペプチドそのすべての部位に20種のアミノ酸を持つ集団を考えてみると、理論的には20<sup>15</sup>=3×10<sup>19</sup>種類の配列を有することになるが、すでにその配列すべてを持つ集団を試験管内に再現できない。この大分子集団のなかで一定の立体構造を持ちうる分子がどの程度を占めるか、さらには特定の分子Xと安定な複合体をつくる分子の存在確率は、といった根本的疑問に対する答えは存在するのだろうか。

## 抗体単離のソースは

抗体を創薬に結びつけようとする場合に、“抗体を試薬として利用する”または“抗体をそのまま治療薬として用いる”例が考えられる。では、抗体調製にいかなる方法があるか。

1. 最も頻繁に用いられているのは、精製した抗原を有し、その抗原を用いて動物を免疫し抗体産生を誘導する方法である。まずポリクローン抗体を含む抗血清が得られるが、細胞融合法によるモノクローン抗体産生細胞作製技術も確立している。ヒト抗体産生トランスジェニック動物がつけられたことからヒト抗体を得ることも可能である。ファージディスプレイ法を用いて産生されている抗体を遺伝子レベルでライブラリー化したのち、モノクローン抗体として単離する方法も開発された。筆者のグループでは、蛍光標識した抗原を用いて抗体産生細胞に印をつけて、それをメルクマールにして1細胞化し、DNA再編成した抗体遺伝子( $V_HDJ_H$ および $V_LJ_L$ )をゲノムDNAから直接クローン化する方法を開発した(森野ら、論文準備中)。
2. ウイルスや病原菌が感染し発病した患者の体内では、その治癒過程で大量のウイルス中和抗体、病原菌毒素中和抗体が産生されている。同様に、各種ワクチン接種者の体内にも中和抗体産生が誘導される。抗体が存在することは、その抗体産生細胞が体内に存在することを意味する。感染やワクチン接種直後だけでなく、過去において、感染経験のあるヒト体内にも少数ではあるが、記憶細胞の形でその抗原に対する抗体産生細胞が長期間存在する。このことが元来“一度病気になると二度同じ病気にかからない”，よく知られた免疫現象の基礎である。それぞれの抗体産生細胞が、ヒトの体内でどの器官に頻度高く存在するかについて詳細にはわかっていないと思うが、経験的に、これら中和抗体をつぎの3通りの方法を用いて確実にモノクローン化可能である。
  - ① 多くのヒト(それぞれ免疫学的経歴が異なる)

る)の器官(扁桃、臍帯血、骨髓、末梢血)のBリンパ球画分からmRNAを調製し、作製した巨大抗体ライブラリーを用いる(筆者らのグループでは1,000億種のクローンからなるAIMSライブラリーを作製し使用している)。

- ② 特定のヒト(標的抗原に対する抗体を有することが判明している個人)から成分採血(リンパ球画分)して、それから抗体ライブラリーを作製しモノクローン抗体を得る(筆者らのグループでは、ハブ毒中和抗体単離を例にこの方法に関する技術開発に成功した)。
- ③ 上述した1細胞化を通して直接抗体遺伝子を得る。

以上の方法を駆使して筆者のグループでは、すでに水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)(鈴木ら、富山医科薬科大学・白木公康教授との共同研究)、インフルエンザウイルス(廣野ら、大阪公衆衛生研究所・奥野良信博士との共同研究)、ロタウイルス(守口ら、本学・谷口孝喜教授との共同研究)、ジフテリア毒素および破傷風毒素(柿田ら、国立感染症研究所・高橋元秀博士との共同研究)、ハブ毒素(東ら、沖縄衛生研究所・野崎真敏博士との共同研究)に対して、治療薬として使用可能と判断できる十分に強い中和活性を有するヒト抗体単離調製に成功している。

3. 1および2で述べている方法は、血清中に抗体が存在し、精製抗原を利用できる条件が整っていれば、ライブラリー作製を通して、またはその抗体産生細胞を1細胞化することによりモノクローン化できることを示している。さらにこの方法はすべての脊椎動物(たとえばニワトリ、ウサギ、ラクダを含む)を対象に応用できる。さらにこの方法は抗体が関与した自己免疫疾患の患者に対しては、その抗体が対象とする未知抗原の同定、その抗原を用いた抗体産生細胞の単離へ道が開けると考えている。
4. 体内での抗体レパートリーは、抗原侵入前ですでにつくられている。そこで体内の抗体産

生細胞群は、抗原による刺激を受けて成熟した(抗原結合力を増した)抗体からなる群と、抗原による刺激を受けていないナープ抗体群に大きく分けられる。ファージディスプレイ系を用いた抗体ライブラリー作製技術は、このナープ抗体レパートリーをそのまま反映した抗体セットを膜上に発現したファージ集団作製を可能にした。この抗体ライブラリーを使用すると、結合力は必ずしも強くなくてもよいならば( $10^6 \sim 10^7 M^{-1}$ )、さまざまな抗原に対して網羅的な抗体単離が可能である。

以上のように、組換え DNA 技術の進歩に基づく抗体単離技術は近年飛躍的に進んだ。それでは創薬にどのように利用できるか。

#### 網羅的抗体単離に関して— 既知抗原に対して

いままでの生物学の研究様式と異なり、ゲノムサイエンスがもたらした最大のインパクトはその網羅性にある。ゲノムサイエンスにおける蛋白質機能解析のツールとして抗体の利用法を開発する場合も、網羅的に適用可能な技術であることが条件となる。筆者らのグループでは国立遺伝学研究所・小原雄治教授のグループと協力して、*C. elegans* の母系遺伝子約 800 種を対象として、その蛋白質レベルでの発現パターンを抗体を用いて解析することとした。蛋白質レベルでの発現パターン解析には、対象とする蛋白質に GFP のような蛍光を発するタグをつける、もしくは抗体で検出可能なタグをつけて抗体で同定することが通常行われている方法だが、artifact のない“ありのままの姿”を検出しようとする場合に、対象抗原を選択的に検出する抗体の使用がベストである。

本稿の主題は、“創薬の戦略”であるが、筆者らの試みを historical に紹介する。ここで記すことは、抗体利用に関するさまざまな教訓を含むと考えるからである。

すでに、対象とする多数の遺伝子に関して、塩基配列が判明した cDNA クローンが利用可能であるとすれば、それを蛋白質(ポリペプチド鎖)として発

現したのち精製し、それを抗原として用いて上述したファージ抗体ライブラリー(AIMS)をスクリーニングすれば、網羅的に抗体を単離できる。これが最初のプリミティブな考えであった。抗体を発現したファージ粒子(ファージ抗体)は、スクリーニングに用いた抗原に結合させることにより単離可能である。筆者らの AIMS ライブラリーはレパートリーが十分に巨大であり、どのような抗原に対しても最低数種類のモノクローン抗体が単離された。

筆者らの研究目的では、その遺伝子の発現パターンを蛋白質レベルで解析する検出試薬として単離した抗体を用いる。そこで抗体に要求される性質は、免疫染色のために固定した状態の標的蛋白質に選択的に結合することである。さまざまな配列をした多数の cDNA から特定領域を PCR で増幅してその配列を確認しつつ、大腸菌発現系(PET システムを用いた)で発現させ、抗原を精製する(His-tag-Ni カラム系)操作を効率よく high-throughput に実施するために、それぞれの蛋白質のなかから約 150 アミノ酸残基からなる部分を選ぶことにした。そうすると 80~90%の確率で精製抗原を調製できる。大腸菌発現系でよく起こる“組換え蛋白質が合成されない”率が低かった。この蛋白質のなかの一部である 150 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖が形づく立体構造が、免疫染色を行う際の対象蛋白質の立体構造の一部を正しく反映しているならば、筆者らの戦略は有効に機能すると予想された。結果は、期待を裏切るものであった。High-throughput に実施するどころか、多くの抗原に対して単離した多数の抗体のなかから、正しく染色できたと考える抗体を数個見いだすのがやっとであった。この失敗は、ファージ抗体ライブラリーを有効に用いるために多くの示唆を与えた。もし、抗原として個々の蛋白質の全長を含み、正しい立体構造をしたものが準備されているならば(実はこの条件を満たした蛋白質を high-throughput に調製することが、蛋白質の機能解析—構造解析における現在の最も重要で困難な課題だが)、ファージ抗体ライブラリーのスクリーニングで十分性能のよい抗体単離を期待できる。

PET システムで合成される約 150 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖は、70%くらいが不溶性で、