

**Fig. 7.** Subcellular localization of anti-WASP scFvs. Cell extracts of (A) anti-WASP scFvs transgenic T cells and (B) anti-WASP scFv DNA-transfected NIH-3T3 cells were fractionated into the subcellular compartments, cytosolic proteins and membrane/membrane organelles. The fractionated cell extracts were analyzed by Western blotting with Myc tag, WASP or Ribophorin I antibodies. (C) Co-localization of anti-WASP scFv and endogenous WASP in the cytosol of T cells. Anti-WASP scFv 21SHL-CL DNA electroporated T cells were fixed and incubated with Myc tag antibody or WASP mAb. After being washed, the cells were stained with FITC-conjugated anti-rabbit IgG or Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse IgG. The treated cells were analyzed and photographed at  $\times 100$  using immunofluorescence microscopy. (D) Anti-WASP scFvs were not polyubiquitinated in the scFv transgenic mice T cells. Immunoprecipitates with Myc tag antibody (lanes 1 and 2) and cell lysates (lanes 3 and 4) from anti-WASP scFv 21SHL transgenic (lanes 1 and 3) or 21SHL-CL transgenic (lanes 2 and 4) mice T cells were analyzed by Western blotting with Myc tag or ubiquitin antibody. The smear bands (arrow) indicate polyubiquitination of nonspecific proteins in the T cells. The arrowhead indicates secondary antibody cross-reactive nonspecific proteins.

cipitates with Myc tag antibody were immunoblotted with ubiquitin antibody to determine if polyubiquitination of the anti-WASP scFv 21SHL and 21SHL-CL occurs in the T cells. 21SHL and 21SHL-CL were not polyubiquitinated in the scFv-transgenic T cells. However, the polyubiquitination of nonspecific proteins was observed in the scFv-transgenic T cell lysate (Fig. 7D). These results indicate that the scFv genes with signal sequence are translated in the ER, and, after cleavage of the signal peptide sequence, are translocated from the ER into the cytosol without polyubiquitination and degradation.

## Discussion

In this study, we show that the scFv intrabodies constructed with a leader signal sequence at the N-terminus inhibited the domain function of a cytosolic protein, and preserved the strong binding activity for target molecules under the reducing conditions of the cytosol in scFv-transgenic lymphocytes.

This study also demonstrates that the successful expression of intrabodies in the cytosol is related to translational efficiency, post-translational processing, and modification of scFvs. We constructed several scFvs with or without the N-terminal leader sequence of the  $V_H$  region and with or without the  $C_{L1}(\kappa)$  region following the  $V_L$  region (Fig. 2B). Fusion of scFvs with the  $C_{L1}(\kappa)$  region has already been shown to increase intracellular stability and target protein inactivation in some cases, but not all [30,31]. scFvs containing the  $V_H$  signal sequence and  $C_{L1}(\kappa)$  region (SHL or SHL-CL formats) were highly expressed in T cells compared with scFvs not containing the  $V_H$  signal sequence (HL or HL-CL formats) (Fig. 3A). Binding activity of 18SHL/SHL-CL and 21SHL/SHL-CL scFvs was detected, but not in the HL/HL-CL formats, by *in vitro* binding assay using GST pull-down (Fig. 3B). These results strongly suggest that scFvs with the native  $V_H$  signal sequence and  $C_{L1}(\kappa)$  region increase the binding capabilities of scFv intrabodies in T cells.

In this study, we established two hybridoma cell lines (clones 18 and 21) producing WASP EVH1 mAbs which were able to equivalently immunoprecipitate with native WASP in T cells. Then we isolated cDNA fragments for assembling anti-WASP scFvs from them. Although the expression levels of 18SHL/SHL-CL and 21SHL/SHL-CL were almost the same in the scFv gene-transfected T cells, 21SHL/SHL-CL bound more strongly to GST-WASP15 than 18SHL/SHL-CL (Fig. 3A,B). Furthermore, a strong interaction between native WASP and 21SHL/SHL-CL scFvs was detected

by immunoprecipitation analysis, whereas 18SHL/SHL-CL scFvs and other scFvs were not able to associate with the native WASP *in vivo* (Fig. 3C). Also, the EVH1 domain-specific binding of 21SHL/SHL-CL was demonstrated (Fig. 3D). These results indicate that the differences in *in vivo* binding activity between 18SHL/SHL-CL and 21SHL/SHL-CL may be due to folding. This structural property is necessary for antigen binding, when antibody fragments are converted into the scFv format and expressed in the reducing environment of the cytosol.

The primary mechanism for protein degradation of misfolded proteins is the ubiquitin–proteasome system which governs the quality control of proteins. Misfolded proteins synthesized by cotranslational or post-translational events in the ER are retro-translocated from the ER into the cytosol and rapidly degraded after polyubiquitination [26–29]. Immunoglobulin heavy and light chains are cotranslated and assembled with disulfide bonds in the ER lumen. An ER resident chaperone, Bip, binds to the constant region of immunoglobulin and stabilizes and maintains the integrity of the immunoglobulin form [32,33]. Bip contains the ER retention signal sequence KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) at the C-terminus and elaborates the tertiary structure of immunoglobulin during translocation from the ER to the secretory pathway. In general, it was thought that the scFv intrabodies constructed with leader signal sequences cross the rough ER membrane and enter the secretory pathway through the *trans*-Golgi network. However, in this study the majority of scFvs were detected in the cytosolic fraction (Fig. 7A), and not in the T-cell culture supernatant (data not shown). These results indicate that the scFvs constructed with the signal sequence can be transferred from the ER to the cytosol by retro-translocation without polyubiquitination and proteasome degradation. We propose two possible interpretations of these results. One is that ubiquitination is not coupled with retro-translocation as has been shown for cholera toxin release from the ER into the cytosol accompanied by rapid folding [34]. The other is that the scFv modifications of the N-terminal residues occur after cleavage of the signal sequence in the ER. In MyoD, which is a tissue-specific transcriptional activator that acts as a master switch for muscle development, modification of the N-terminal residue protects it from ubiquitination and protein degradation irrespective of the presence of internal lysine residues [35]. In T cells, scFvs constructed with the V<sub>H</sub> signal sequence seem to be modified at the N-terminal residue after cleavage of the signal peptide sequence in the ER. However, we

have not yet confirmed the N-terminal amino-acid sequence of scFvs by the Edman method.

Interestingly, when NIH-3T3 cells were transfected with the 21SHL-CL scFv (containing the V<sub>H</sub> signal sequence) or the 21HL-CL scFv (not containing the V<sub>H</sub> signal sequence), most of the 21SHL-CL scFv was detected in the membrane fraction, whereas the 21HL-CL scFv accumulated in the cytosol (Fig. 7B). These results indicate that the mechanisms of retro-translocation differ among different cell types. Although we do not know the mechanisms leading to retro-translocation without proteasome degradation, the scFv intrabodies constructed with signal sequences may be designed for practical use in functional knockdown of cytosolic proteins in T cells.

T cells from WASP-deficient mice showed a marked reduction in antigen receptor capping accompanied by actin polymerization and IL-2 production induced by TCR stimulation. It has been hypothesized that defects in IL-2 production in WASP-deficient T cells may be a secondary phenomenon resulting from defects in actin remodeling and immune synapse formation induced by TCR stimulation [17,18,36,37]. However, we previously demonstrated that T cells from WASP15 transgenic mice that overexpress WASP-EVH1 domain were impaired with respect to proliferation and IL-2 production induced by TCR stimulation, but antigen receptor capping and actin polymerization were normal [24]. This suggests the direct involvement of the EVH1 domain in the IL-2 synthesis pathway. In the present study, purified anti-WASP scFv 21SHL and 21SHL-CL transgenic T cells were impaired with respect to proliferation and IL-2 production induced by CD3 $\epsilon$  antibody stimulation (Figs 5A and 6A). In terms of cytoskeletal rearrangement, normal antigen receptor capping induced by CD3 $\epsilon$  antibody stimulation was observed similar to the wild-type and WASP15 transgenic mice T cells (Fig. 6B). These results indicate that the role of WASP in regulating IL-2 production is independent of its role in immune synapse formation. The following experimental data support this hypothesis. WASP-deficient T cells form conjugates with antigen-specific B cells normally and can form immune synapses accompanied by polarization of cytoskeleton-regulating proteins, but defects in IL-2 production are observed [38]. Furthermore, analysis of a series of WASP-deletion mutants shows that the WASP homology-1 (WH1)/EVH1 domain is responsible for NF-AT transcriptional activation [39]. These findings indicate that the functions of WASP may be more complex than previously believed.

The inability of WASP-deficient, WASP15 transgenic, and anti-WASP scFv 21SHL/SHL-CL transgenic

T cells to proliferate in response to TCR stimulation is similar to the defects observed in T cells from Vav-deficient mice [40,41]. It has been previously shown that Vav is a potent regulator of the IL-2 promoter, in particular NF-AT/AP-1-mediated gene transcription [42]. Furthermore, the WASP-interacting protein (WIP) and WASP interaction is important for Vav-mediated activation of NF-AT/AP-1 gene transcription induced by TCR stimulation [43]. WIP-deficient T cells were impaired in proliferation and immune synapse formation induced by TCR stimulation [44]. It is possible that the overexpressed WASP15 and anti-WASP 21SHL/SHL-CL scFvs inhibit WIP and endogenous WASP interactions, because the WIP-binding site in endogenous WASP is included in WASP15 and may overlap the target region of our anti-WASP scFvs. The molecules that interact with the EVH1 domain which overlaps our scFv intrabody-binding epitope need to be identified.

We examined the effects of anti-WASP 21 SHL/SHL-CL scFvs on lymphocyte development and B-cell function. The anti-WASP scFvs did not have a marked effect on lymphocyte development (Fig. 5C–E). Furthermore, B cells from anti-WASP 21 SHL/SHL-CL scFv transgenic mice proliferated normally in response to stimulation by IgM and CD40 antibodies (Fig. 5B). B cells from WASP-deficient and WASP15 transgenic mice also proliferated normally after IgM antibody stimulation [17,18,24]. We have not yet clarified the significance of WASP expression in B lymphocytes.

Finally, we demonstrate here that scFv intrabodies bind to the EVH1 domain of WASP and inhibit IL-2 synthesis in T cells. Therefore, scFv intrabodies should be valuable tools for identifying novel protein functions, and transgenic mice that express scFv intrabodies may be useful in functional knockdown models.

## Experimental procedures

### Construction of GST fusion protein and mAb preparation

A cDNA fragment for mouse WASP exon 1–5 (amino acids 1–171) which includes the EVH1 domain (designated WASP15) was generated by PCR (sense primer, 5'-CGAATGCGGCCGCAATGAATAGTGGCCCTG-3'; reverse primer, 5'-CGAATGCGGCCGCTCACTCCTCATTGATTGG-3') [24], digested with *NotI*, and subcloned into the pGEX-4T-2 expression vector (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). The GST-WASP15 fusion protein was produced in BL21 *Escherichia coli* cells and purified on a glutathione-Sepharose 4B affinity chromatography column (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's

instructions. mAbs were prepared from mice immunized with GST-WASP15 fusion protein by the conventional procedure.

### Cloning and construction of WASP-EVH1 scFv intrabodies

We identified subtype mAbs (18, 21) using a mouse mAb isotyping kit IsoStrip (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). We performed a four-step PCR to generate appropriate cDNA fragments that encoded the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> region. Total RNA from hybridoma cells was reverse-transcribed using the SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The cDNA fragments for the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> regions containing the leader signal sequence and CH1 or C<sub>L</sub> constant region sequences were generated by PCR using subtype-specific primers (heavy chain, clone 18, IgG3: sense primer 5'-CTAATACGACTC ACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' and reverse primer 5'-GTACTGGGCTTGGGTATTCTAGGCTC-3'; clone 21, IgG2b: sense primer 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCG-3' and reverse primer 5'-GGACAGGGGTTGATTGTTGAAATGGG-3'; light chain, clone 18 and 21, κ: sense primer 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' and reverse primer 5'-CCTGTTGAAGCTCTTGACAATGGGTG-3'). The second PCR products for V<sub>H</sub> region were classified into two forms containing the native V<sub>H</sub> leader signal sequence at the 5' end of the V<sub>H</sub> fragment (SV<sub>H</sub> form) or no V<sub>H</sub> leader signal sequence (V<sub>H</sub> form). The second PCR amplification was performed with the following primers: 18SV<sub>H</sub>, sense primer 1 and reverse primer 2; 18V<sub>H</sub>, sense primer 3 and reverse primer 2; 21SV<sub>H</sub>, sense primer 4 and reverse primer 5; 21V<sub>H</sub>, sense primer 6 and reverse primer 5; 18V<sub>L</sub>, sense primer 7 and reverse primer 8; 21V<sub>L</sub>, sense primer 9 and reverse primer 10. Primer sequences are shown in the legend to Fig. 2. The third PCR products were amplified using the following primers: 18SV<sub>H</sub>-linker, sense primer 1 and reverse primer 11; 18V<sub>H</sub>-linker, sense primer 3 and reverse primer 11; 21SV<sub>H</sub>-linker, sense primer 4 and reverse primer 12; 21V<sub>H</sub>-linker, sense primer 6 and reverse primer 12; linker-18V<sub>L</sub>, sense primer 13 and reverse primer 8; linker-21V<sub>L</sub>, sense primer 14 and reverse primer 10. The third PCR products were mixed in the following combinations: 18SV<sub>H</sub>-linker and linker-18V<sub>L</sub>, 18V<sub>H</sub>-linker and linker-18V<sub>L</sub>, 21SV<sub>H</sub>-linker and linker-21V<sub>L</sub>, 21V<sub>H</sub>-linker and linker-21V<sub>L</sub> and single-chain antibodies, scFvs, designated 18SHL, 18HL, 21SHL, and 21HL assembled by the fourth PCR amplification using the following primers: 18SHL, sense primer 1 and reverse primer 8; 18HL, sense primer 3 and reverse primer 8; 21SHL, sense primer 4 and reverse primer 10; 21HL, sense primer 6 and reverse primer 10. The fourth PCR products were digested with *HindIII-NotI* and cloned into the pCAGGS-MCS expression vector [45,46]. The Myc tag

(EQKLISEEDL) was generated as follows: coding linker containing a *NotI* site at the 5' end of the linker (5'-GGC CGCAGGTTTCGGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAG GACCTGTAG-3') and noncoding linker containing an *EcoRI* site at the 5' end of the linker (5'-AATTCTACAGG TCCTCCTCGTGATCAGCTTCTGCTCCGAACCTGC-3') were annealed and inserted into the *NotI/EcoRI* site of all pCAG/anti-WASP EVH1 scFvs. All anti-WASP scFvs were fused with the Myc tag at the C-terminus. Moreover, to generate a cDNA fragment for the C<sub>L</sub>(κ) region, total RNA from hybridoma producing clone 18 mAb was reverse-transcribed and a two-step PCR amplification performed using the following primers: first PCR, sense primer 5'-GAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG-3' and reverse primer 5'-TGGTGGTGGCGTCTCAGGACCT TTG-3'; second (nested) PCR, sense primer 5'-CGAATGC GGCCGAGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC-3' and reverse primer 5'-CGAATGCGGCCGACACTCATTCC TGTTGAAGCTCTTGAC-3'. The PCR product for the C<sub>L</sub>(κ) region was digested with *NotI* and cloned into the *NotI* site between the scFv and Myc tag sequences. These constructs were designated pCAG/18SHL-CL, 18HL-CL, 21SHL-CL and 21HL-CL, respectively. All scFv constructs were confirmed by DNA sequencing analysis. A DNA construct, pCAG/T7-WASP15 [24], which contained T7-tagged WASP exon 1–5, was used for evaluation of EVH1 domain-specific binding.

### Cells and electroporation/transfection

The T-cell hybridoma DO-11.10 [47] was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U·mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin, 4 mM L-glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol (2-ME) and 10 mM Hepes (all obtained from Gibco, Carlsbad, CA, USA). DO-11.10 cells, adjusted to a concentration of 5 × 10<sup>6</sup> cells/400 µL culture medium with 1.25% dimethyl sulfoxide per cuvette, were electroporated using a Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with 40 µg plasmid DNA at 290V and 960µF. NIH-3T3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, 50 U·mL<sup>-1</sup> penicillin, 50 µg·mL<sup>-1</sup> streptomycin and 4 mM L-glutamine. NIH-3T3 cells adjusted to a concentration of 1 × 10<sup>6</sup> cells/10 cm dish were transfected with 10 µg plasmid DNA using FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics).

### Immunoprecipitation and Western blot analysis

The electroporated T cells and anti-WASP scFv transgenic T and B cells were lysed with digitonin buffer (10 mM triethanolamine, 10 mM iodoacetamide, 1% digitonin, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, and Complete<sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail; Roche Diagnostics), incubated with 5 µg·mL<sup>-1</sup> WASP mAb (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA,

USA), Myc tag mAb (MBL, Nagoya, Japan) or biotinylated T7 tag mAb (Novagen, Madison, WI, USA) and immunoprecipitated by the addition of 40 µL protein G-Sepharose or streptavidin-agarose (Upstate, Charlottesville, VA, USA). The cell lysates and immunoprecipitates were separated by SDS/PAGE (12.5% gel) and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad). Blots were probed with Myc tag mAb, WASP mAb, T7 tag mAb, Ribophorin I mAb and ubiquitin mAb (Santa Cruz Biotechnology), followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark). Immunoreactive proteins were detected by ECL (Amersham Biosciences).

### Assay of GST fusion protein binding

After 48 h of electroporation, cell lysates (1 × 10<sup>7</sup> cells) were prepared by lysis with 10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 1% NP-40, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA and Complete<sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail (TNE) buffer, cleared by centrifugation, and treated with excess glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences). The precleared cell lysates were incubated at 4 °C overnight with glutathione-Sepharose beads bound to 50 µg GST fusion proteins. Beads were washed with TNE buffer, lysed with SDS sample buffer, and immunoblotted with Myc tag mAb.

### Generation of transgenic mice

The transgene was excised from the plasmid vector with *SalI/NheI* restriction enzyme, purified by agarose gel electrophoresis and a QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany), adjusted to a final concentration of 3 µg·mL<sup>-1</sup>, and microinjected into the fertilized egg pronuclei of C57BL/6J inbred strain mice. The injected eggs were then transferred into the oviducts of pseudopregnant female ICR mice.

### Antigen receptor stimulation

T and B cells were purified from WASP15 transgenic, anti-WASP scFv transgenic mice spleens or age-matched wild-type control mice by magnetic cell sorting using autoMACSTM (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. T and B cells were isolated by negative or positive selection using microbeads conjugated to mouse CD45R (B220) antibodies (Miltenyi Biotec). The cell purity of both the resulting populations exceeded 90%, as confirmed by FACS analysis. For the T-cell proliferation assay, CD3ε antibodies (145–2C11; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) were adhered to 96-well tissue culture plates by incubating 20 µg·mL<sup>-1</sup> in NaCl/P<sub>i</sub>, pH 8.0, at 4 °C for 6 h, after which the plates were washed with NaCl/P<sub>i</sub>, pH 7.2. Purified T cells were added to the antibody-coated wells (5 × 10<sup>4</sup> cells/well) and cultured at

37 °C in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum. For the B-cell proliferation assay, B cells were cultured in 96-well tissue culture plates ( $5 \times 10^4$  cells/well) in culture medium alone or in the presence of mouse IgM antibody F(ab')<sub>2</sub> ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) and CD40 antibody ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; BD Pharmingen). Each stimulation was performed in the presence of exogenous IL-4 ( $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; PeproTech, London, UK). After 48 h of incubation,  $10 \mu\text{M}$  5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was added to the T and B cell cultures. The cells were reincubated for an additional 16 h, and then BrdU incorporation during DNA synthesis in proliferating cells was quantified by Cell Proliferation ELISA (Roche Diagnostics) as described by the manufacturer. For evaluation of cytokine production, purified T cells from the spleens of wild-type, WASP15 transgenic or anti-WASP scFv transgenic mice were cultured on CD3 $\epsilon$  antibody-coated 48-well tissue culture plates. The cell culture supernatant was collected at 24 h. IL-2 in the supernatant was quantified by ELISA using OptEIA set for mouse cytokine (BD Pharmingen) according to the manufacturer's instructions.

### FACS analysis

Single-cell suspensions of lymphoid cells were prepared and stained with antibodies following standard procedures. Antibodies to CD3, CD4, CD8, IgM or B220 (polyethylene or FITC conjugated; Immunotech, Marseille, France) were used to stain the cells.

### T-cell capping

Purified T cells from the spleens of wild-type, WASP15 transgenic or anti-WASP scFv transgenic mice were incubated in RPMI 1640 culture medium containing  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  FITC-conjugated CD3 $\epsilon$  antibody (145-2C11; BD Pharmingen) at either 37 °C or 4 °C for 30 min. The treated cells ( $5 \times 10^4$  cells) were placed on polyethylenimine-coated eight-well tissue culture glass slides (BD Falcon, Bedford, MA, USA) that were preincubated with 0.01% polyethylenimine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at room temperature for 1 h and dried at 4 °C overnight. They were then fixed in 3.5% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich). After being washed with NaCl/P<sub>i</sub>, cells were sealed with coverslips and immediately analyzed and photographed at  $\times 100$  by confocal microscopy (FV300; Olympus, Tokyo, Japan). The rate of capping of unstimulated and stimulated T cells was determined by counting the number of caps in  $\approx 200$  cells/experiment.

### Subcellular localization of scFv intrabodies

Cell extracts of anti-WASP scFv transgenic T cells and scFv DNA-transfected NIH-3T3 cells were fractionated

into the subcellular compartments, cytosolic proteins and membrane/membrane organelles, by differential solubilities using a ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Subcellular localization of scFv intrabodies was analyzed by Western blotting using the fractionated extracts.

### Immunostaining

After 48 h of scFv DNA electroporation, cells were placed on polyethylenimine-coated eight-well tissue culture glass slides ( $5 \times 10^4$  cells/well), fixed with 95% ethanol/acetic acid (99 : 1, v/v) at 4 °C for 15 min, and blocked with NaCl/P<sub>i</sub> containing 1% BSA and 5% normal goat serum (Sigma-Aldrich) for 15 min. Then cells were incubated with Myc tag mAb or WASP mAb and stained with FITC-conjugated anti-rabbit IgG (Biosource, Camarillo, CA, USA) and Alexa Fluor 546-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) after being washed with NaCl/P<sub>i</sub>/0.05% Tween 20. The cells were photographed at  $\times 100$  by immunofluorescence microscopy (DM RBE; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### Statistical analysis

Statistical significance was assessed using Student's *t* test. The differences were considered significant when *P* values were less than 0.05.

### Acknowledgements

We thank Dr H. Ohba for helpful discussions. This work was supported by a Coordination Fund from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan (to K.S. and Y.K.). Dr R. Iwaya died in September 2004. This paper is dedicated to his memory.

### References

- 1 Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS & Whitlow M (1988) Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423–426.
- 2 Huston S, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R & Oppermann H (1988) Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 5879–5883.

- 3 Barbas CF III, Kang AS, Lerner RA & Benkovic SJ (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7978–7982.
- 4 Zhu H, Biligin M & Snyder M (2003) Proteomics. *Annu Rev Biochem* **72**, 783–812.
- 5 Tuschl T (2002) Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* **20**, 446–448.
- 6 Marasco WA, Haseltine WA & Chen SY (1993) Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 7889–7893.
- 7 Steinberger P, Andris-Widhopf J, Buhler B, Torbett BE & Barbas CF III (2000) Functional deletion of the CCR5 receptor by intracellular immunization produces cells that are refractory to CCR5-dependent HIV-1 infection and cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 805–810.
- 8 Richardson JH, Sodroski JG, Waldmann TA & Marasco WA (1995) Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the alpha subunit of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 3137–3141.
- 9 Mhashilkar AM, Doeblis C, Seifert M, Busch A, Zani C, Soo Hoo J, Nagy M, Ritter T, Volk HD & Marasco WA (2002) Intrabody-mediated phenotypic knockout of major histocompatibility complex class I expression in human and monkey cell lines and in primary human keratinocytes. *Gene Ther* **9**, 307–319.
- 10 Tanaka T & Rabbitts TH (2003) Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *EMBO J* **22**, 1025–1035.
- 11 Caron de Fromental C, Gruel N, Venot C, Debussche L, Conseiller E, Dureuil C, Teillaud JL, Tocque B & Bracco L (1999) Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments. *Oncogene* **18**, 551–557.
- 12 Alvarez RD, Barnes MN, Gomez-Navarro J, Wang M, Strong TV, Arafat W, Arani RB, Johnson MR, Roberts BL, Siegal GP, *et al.* (2000) A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD 21): a phase I trial. *Clin Cancer Res* **6**, 3081–3087.
- 13 Worn A & Pluckthun A (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* **305**, 989–1010.
- 14 Ochs HD, Slichter SJ, Harker LA, Von Behrens WE, Clark RA & Wedgwood RJ (1980) The Wiskott–Aldrich syndrome: studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. *Blood* **55**, 243–252.
- 15 Remold-O'Donnell E, Rosen FS & Kenney DM (1996) Defects in Wiskott–Aldrich syndrome blood cells. *Blood* **87**, 2621–2631.
- 16 Molina IJ, Sancho J, Terhorst C, Rosen FS & Remold-O'Donnell E (1993) T cells of patients with the Wiskott–Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses. *J Immunol* **151**, 4383–4390.
- 17 Snapper SB, Rosen FS, Mizoguchi E, Cohen P, Khan W, Liu CH, Hagemann TL, Kwan SP, Ferrini R, Davidson L, *et al.* (1998) Wiskott–Aldrich syndrome protein × deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation. *Immunity* **9**, 81–91.
- 18 Zhang J, Shehabeldin A, da Cruz LA, Butler J, Somani AK, McGavin M, Kozieradzki I, dos Santos AO, Nagy A, Grinstein S, *et al.* (1999) Antigen receptor-induced activation and cytoskeletal rearrangement are impaired in Wiskott–Aldrich syndrome protein × deficient lymphocytes. *J Exp Med* **190**, 1329–1342.
- 19 Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U & Abo A (1996) Wiskott–Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* **84**, 723–734.
- 20 Rivero-Lezcano OM, Marcilla A, Sameshima JH & Robbins KC (1995) Wiskott–Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Mol Cell Biol* **15**, 5725–5731.
- 21 She HY, Rockow S, Tang J, Nishimura R, Skolnik EY, Chen M, Margolis B & Li W (1997) Wiskott–Aldrich syndrome protein is associated with the adapter protein Grb2 and the epidermal growth factor receptor in living cells. *Mol Biol Cell* **8**, 1709–1721.
- 22 Banin S, Truong O, Katz DR, Waterfield MD, Brickell PM & Gout I (1996) Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP) is a binding partner for c-Src family protein-tyrosine kinases. *Curr Biol* **6**, 981–988.
- 23 Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand JB, Kaiser DA & Pollard TD (2000) Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007–1011.
- 24 Sato M, Tsuji NM, Gotoh H, Yamashita K, Hashimoto K, Tadotsu N, Yamanaka H, Sekikawa K & Hashimoto Y (2001) Overexpression of the Wiskott–Aldrich syndrome protein N-terminal domain in transgenic mice inhibits T cell proliferative responses via TCR signaling without affecting cytoskeletal rearrangements. *J Immunol* **167**, 4701–4709.
- 25 Tsai B, YeY & Rapoport TA (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 246–255.
- 26 Hershko A, Ciechanover A & Varshavsky A (2000) The ubiquitin system. *Nat Med* **6**, 1037–1081.
- 27 Weissman AM (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 169–178.
- 28 Coux O, Tanaka K & Goldberg AL (1996) Structure and function of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 801–847.

- 29 Ellgaard L & Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181–191.
- 30 Mhashilkar AM, Bagley J, Chen SY, Szilvay AM, Heland DG & Marasco WA (1995) Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J* **14**, 1542–1551.
- 31 Zhu Q, Zeng C, Huhlov A, Yao J, Turi TG, Danley D, Hynes T, Cong Y, DiMattia D, Kennedy S, *et al.* (1999) Extended half-life and elevated steady-state level of a single-chain Fv intrabody are critical for specific intracellular retargeting of its antigen, caspase-7. *J Immunol Methods* **231**, 207–222.
- 32 Munro S & Pelham HR (1986) An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* **46**, 291–300.
- 33 Flynn GC, Pohl J, Flocco MT & Rothman JE (1991) Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature* **353**, 726–730.
- 34 Lencer WI & Tsai B (2003) The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. *Trends Biochem Sci* **28**, 639–645.
- 35 Breitschopf K, Bengal E, Ziv T, Admon A & Ciechanover A (1998) A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J* **17**, 5964–5973.
- 36 Dustin ML & Cooper JA (2000) The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* **1**, 23–29.
- 37 Krawczyk C & Penninger JM (2001) Molecular controls of antigen receptor clustering and autoimmunity. *Trends Cell Biol* **11**, 212–220.
- 38 Cannon JL & Burkhardt JK (2004) Differential roles for Wiskott–Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol* **173**, 1658–1662.
- 39 Silvin C, Belisle B & Abo A (2001) A role for Wiskott–Aldrich syndrome protein in T-cell receptor-mediated transcriptional activation independent of actin polymerization. *J Biol Chem* **276**, 21450–21457.
- 40 Fischer KD, Kong YY, Nishina H, Tedford K, Marengere LE, Kozieradzki I, Sasaki T, Starr M, Chan G, Gardener S, *et al.* (1998) Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr Biol* **8**, 554–562.
- 41 Holsinger LJ, Graef IA, Swat W, Chi T, Bautista DM, Davidson L, Lewis RS, Alt FW & Crabtree GR (1998) Defects in actin-cap formation in Vav-deficient mice implicate an actin requirement for lymphocyte signal transduction. *Curr Biol* **8**, 563–572.
- 42 Wu J, Katzav S & Weiss A (1995) A functional T-cell receptor signaling pathway is required for p95vav activity. *Mol Cell Biol* **15**, 4337–4346.
- 43 Savoy DN, Billadeau DD & Leibson PJ (2000) WIP, a binding partner for Wiskott–Aldrich syndrome protein, cooperates with Vav in the regulation of T cell activation. *J Immunol* **164**, 2866–2870.
- 44 Anton IM, de la Fuente MA, Sims TN, Freeman S, Ramesh N, Hartwig JH, Dustin ML & Geha RS (2002) WIP deficiency reveals a differential role for WIP and the actin cytoskeleton in T and B cell activation. *Immunity* **16**, 193–204.
- 45 Niwa H, Yamamura K & Miyazaki J (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193–199.
- 46 Takemoto Y, Furuta M, Sato M, Kubo M & Hashimoto Y (1999) Isolation and characterization of a novel HS1 SH3 domain binding protein, HS1BP3. *Int Immunol* **11**, 1957–1964.
- 47 Shimonkevitz R, Kappler J, Marrack P & Grey H (1983) Antigen recognition by H-2-restricted T cells. I. Cell-free antigen processing. *J Exp Med* **158**, 303–316.

## 血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発

黒澤 良和

日本血液代替物学会  
The Society of Blood Substitutes, Japan



## 血液代替物としての治療用ヒト抗体の開発

# Development of Therapeutic Human Antibodies against Various Diseases as Blood Substitutes

黒澤良和

Yoshikazu Kurosawa

### 和文抄録

組換えDNA技術の進歩により、様々な疾患に対する治療薬としてヒト抗体を単離調製することが可能となった。筆者らは厚生労働省の研究費による人工血液開発研究として「臨床に役立つヒト抗体開発研究」を実施している。具体的には、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を基盤技術として、ウイルス感染症（VZV、インフルエンザウイルス、ロタウイルス）に対してはウイルスを中和する能力のある抗体単離、病原菌毒素（ジフテリア毒素、破傷風毒素、ボツリヌス毒素）に対しては毒素中和抗体、さらにハブ毒中和抗体の単離調製に成功した。単離調製した抗体に関しては、臨床試験を開始すべき段階に達している。一方、細胞膜上に存在する多数の抗原分子に対して網羅的に抗体を単離する技術開発に成功し、その結果癌特異抗原の同定とそれに対する治療用ヒト抗体の同時単離が可能となった。本文では、我々が行っている様々な疾患に対する治療用ヒト抗体単離に関して、研究開発過程の総括及び現状紹介を行う。

### Abstract

Recent progress in DNA recombinant technology allows us to prepare therapeutic antibodies against various diseases. We have been working on the project "Development of therapeutic antibodies against infectious diseases" which has been supported by a grant for Research on Pharmaceutical and Medical Safety from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan. By using a phage-display technology, we made various antibody libraries. From them we have already isolated human antibodies against viruses (VZV, influenza virus and rotavirus), bacterial toxins (diphtheria toxin, tetanus toxin and botulinum toxin) and snake venom (habu toxin). In all the cases, isolated antibodies show strong neutralizing activities and we could start clinical examinations. We also succeeded to develop a new method by which we can comprehensively isolate antibodies against virtually all the epitopes present on the cell surface. Using this technology, we have been performing a big project "Isolation of therapeutic antibodies against various cancers". In this review, I summarize a history of our research and discuss the present status of our project.

### Keywords

artificial antibodies, antibody libraries, therapeutic antibodies, infectious diseases, cancers

### はじめに

厚生労働省（当時厚生省）が平成9年度から高度先端医療研究事業として人工血液開発研究を対象に補助金交付を開始した。研究分野は1. 人工赤血球（酵素運搬）、2. 人工血小板（止血）、3. 人工免疫グロブリンであった。筆者の研究グループは、この事業（分野3）を推進することとなり7年以上にわたって「臨床に役立つヒト抗体開発研究」を実施している。血

液代替物として考えた時に、赤血球及び血小板と抗体は開発内容が大きく異なっている。前者は、健常人血液中の赤血球や血小板の機能をいかに正確に代替し得るものを作り出すかが求められる。後者では対象疾患があり、治療薬として有効に機能する抗体を疾患ごとに作製することが必要となる。抗体は元来生体防御分子であり、病原菌もしくは病原菌が分泌する毒素、そしてウイルスに対して特異的（選択的）に結合し、結果として

藤田保健衛生大学総合医科学研究部免疫学研究部門・教授 〒470-1192 愛知県豊田市香掛町田楽ヶ窪1-98

Yoshikazu Kurosawa, Ph.D

論文受付 2004年11月29日 論文受理 2004年12月16日

殺傷（中和）し最終的に体内から除去する。健常人は、感染後一度発病することはあっても免疫系が機能し、抗体産生が誘導されて治癒する。そこで感染症に対しては、治療薬として抗体開発を目指すより、発症予防を目的にワクチン開発を行うことが主流であり、事実有効である。しかし臓器移植が広く行われ、その際免疫抑制剤が使用されることを含めて、免疫機能が低下した状態にある患者数が増加し、抗体治療薬開発への期待が高まっている。更に、現在特定の毒素に対する特效薬として治療に用いられている抗血清がウマ血清であり、それをヒト抗体に変換する社会的要請もある。

抗体は、抗原に対して $10^9 \sim 10^{10} M^{-1}$ オーダーの強い結合力を示す。この結合力は、血液（5L）中に当該抗体が7.5-75mg分泌されれば、対象となる抗原分子99%が抗体と結合している状態を作り出せることを意味する。抗体が持つこの高い特異性と強い結合力が注目され、更に1975年に細胞融合を用いたモノクローン抗体作製技術が開発されて様々な分子に特異的に結合する抗体を自在に作製できるようになり、抗体は本来の生体防御分子としてではなく、研究試薬として広く利用されることになった<sup>1)</sup>。

モノクローン抗体作製が可能となってから、癌を中心として抗体を用いた治療薬開発が広範に試みられた。最近になるまでヒトモノクローン抗体作製は困難であったが、マウス/ヒトキメラ抗体、ヒト化抗体とタンパク分子全体でなるべくヒト由来部分を多くした抗体作製技術も開発された<sup>2,3)</sup>。20年以上の長い挫折を繰り返した後、乳癌に対するハーセプチン、Bリンパ腫に対するリツキサンという画期的抗体治療薬が開発された。組換えDNA技術の発展の中で完全ヒト抗体作製も可能となり、製薬企業により現在開発されている薬の20%が抗体であると言われている。本総説では、筆者のグループで得た結果および経験に基づき、様々な疾患に対する抗体治療開発の現状を総括し展望を記述する。

### 抗体分子と抗体遺伝子

抗体は2本の重（H）鎖と2本の軽（L）鎖からなるタンパク質分子である。それぞれ90-110個のアミノ酸残基からなる球状構造（免疫グロブリンホールド）をしたドメインが数珠状につながっている。L鎖は2個のドメインからなり、H鎖は2個のドメインに続いてヒンジ領域があり、更に2個のドメインがつながっている。両鎖のN末端に位置するドメインは、アミノ酸配列が多様であるために可変（V）領域と呼ばれ、HL両鎖のVドメインが抗原結合部に相当する。C末端側はアミノ酸配列が一定であるために定常（C）領域と呼ばれる。各Vドメインは、2面の $\beta$ シートが向き合った立体構造をしており、ループ部分に相当する3箇所、HL両鎖で計6箇所が凸凹構造をした抗原結合面を作り出す。この部分が抗原相補性決定領域（complementarity-determining regionを略してCDR1, 2, 3）と呼ばれている。CDR領域は長さが一定でない場合も含めて多様なアミノ酸配列をしている。その結果、CDRが作り出す立体構造の多様性の総数は莫大になる。様々な形をした抗原に対して、抗体が特異的に結合する能力を示す理由は、莫大な数の抗

体が存在する結果、相補的な関係にある抗原と抗体が様々な結合力（ファンデルワールス力、水素結合、疎水結合、クーロン力）を通して強固な複合体を形成するためである。

抗体は1本のポリペプチド鎖内にアミノ酸配列が多様なV領域と一定の配列をしたC領域を持つ特徴的な分子である。抗体遺伝子座では、動物進化の中で獲得された様々な機構を導入して、様々な抗原に選択的にかつ強い結合力を示す分子を作り出す。抗体が持つべき特徴は、1.多様な抗原に対して選択的（特異的）かつ強固に結合できる、2.抗体が対応すべき抗原は、予め決まっていない。換言すれば、生物界で全く新しい分子が出現しても、それと特異的に結合する抗体が存在する、3.抗原が外来分子であるか、自分自身の分子であるか区別する能力を持つ、という3点に集約できる。この点に関して本小文で詳細を説明できないが、免疫システムの真髄であり、治療薬としての抗体を開発する上でこの特徴を理解することが肝心である。V領域の多様性を作り出すために、V領域をコードする遺伝子は断片化（L鎖でV<sub>L</sub>、J<sub>L</sub>遺伝子、H鎖でV<sub>H</sub>、D、J<sub>H</sub>遺伝子）され、更にそれぞれ多数化し多様化された<sup>4)</sup>。そこで抗体L鎖は、DNA再編成により1組のV<sub>L</sub>とJ<sub>L</sub>遺伝子が選ばれてV<sub>L</sub>J<sub>L</sub>結合が作られる（図1）。抗原結合部位の多様化という視点からは、DNA再編成により作り出されるCDRのアミノ酸配列の種類が問題である。詳細は省くが、ヒトの場合、L鎖が作り出すレパートリー総数は数百種類と考えてよい。

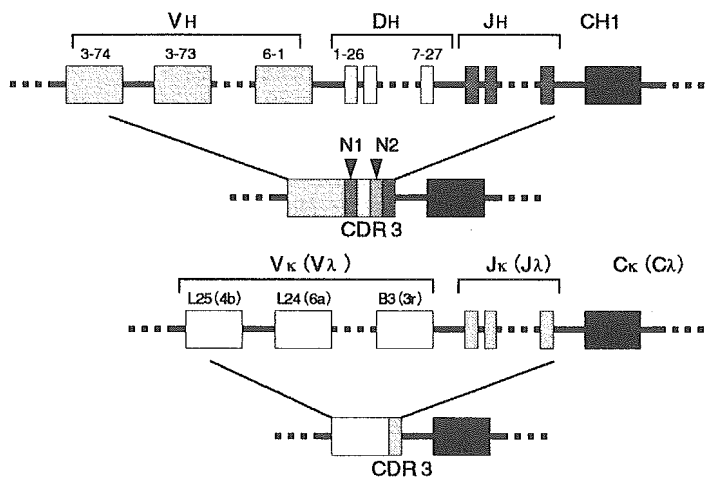


図1. 抗体遺伝子のDNA再編成を示す模式図  
DNAの切断再結合が起こる部分は、抗体V領域のCDR3をコードする領域に相当する。

H鎖はV、J遺伝子に加えてD遺伝子が存在するのでレパートリーは更に大きいと予想されるが、実際は遺伝子総数の問題よりDNA組換え機構の相違がより重要である（図2）。D-J<sub>H</sub>、V<sub>H</sub>-D結合をつくるに際して、末端配列の部分切除（これはL鎖でも見られる）に加えてDNA末端添加酵素（TdT）がN（ヌクレオチドの略）と呼ばれるランダム配列の挿入を行う。鋳型を持たないランダム配列合成は、全生物現象の中でT細胞レセプターと抗体（この分子は進化的に兄弟）のTdTによるこの反応

しか知られていない。結果としてできあがるH鎖V領域レパートリー総数は、造血幹細胞から“独立して分化した”Bリンパ球の総数に匹敵するほど巨大になる。

抗体遺伝子座で起こる以上の分子機構は、未知抗原も含めた多様な抗原に対応する巨大レパートリーを作り出す目標を達成するのに適している。しかし、作り出した抗体群の中に個々の抗原に対応して高い結合力を示す抗体が含まれるかは偶然であり、そのことを必然的にするために体細胞突然変異機構を別途準備している。

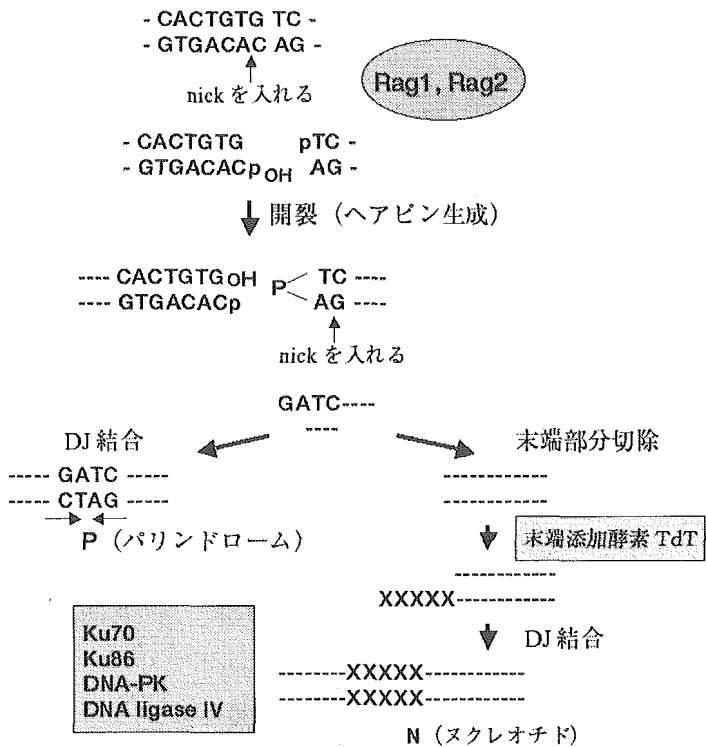


図2. V(D)J DNA再編成過程の模式図  
H鎖のD遺伝子とJ遺伝子間でD-J結合が作られる過程を例に示す。L鎖のVLJL結合ではTdTによるランダム配列(N)の挿入は起こらない。

### in vivo抗体レパートリーとその二重性

ヒト個体あたりBリンパ球総数は、 $10^{11}$ - $10^{12}$ と見積もられる。そこで抗体は、アミノ酸配列が異なる場合“異なる抗体”と判断するなら $10^9$ 種類程度存在するであろう。通常Bリンパ球は比較的短い半減期(2~3週)でturn-overを繰り返している。厳密な意味では単一個体中でも抗体の種類は変化している。「充分巨大である」ことがエッセンスである。このような抗体レパートリーは、抗原の存在と無関係に作られているので“ナイーブレパートリー”と呼ばれる。病原菌やウイルス(外来抗原)の侵入が起こると免疫応答が起こる。体液性免疫の最終段階は当該抗原に強固に結合するIgG型抗体の大量分泌である。その結果、外来抗原は除去され、更にその成熟抗体(体細胞突然変異と抗体産生細胞の選別により当該抗原に対する親和力を増した抗体)を産生するB細胞が記憶細胞として残る。突然変異は基本的にはランダムプロセスなので、親和力が増した抗体

産生細胞の選別機構が存在するから意味を持つ。感染症に罹患した後、その治癒過程で出現する中和抗体を大量に産生する形質細胞や記憶細胞が作り出す抗体レパートリーは、“成熟抗体レパートリー”と呼ばれる。このレパートリーは、個々人の免疫学的経歴に大きく依存する。様々な疾患に対して如何にして治療薬となり得る抗体を単離するかについて、in vivoで見られるこの抗体レパートリーの二重性を考慮する必要がある。in vivoで成熟した抗体の性質は、ウイルスや毒素の中和力からみて非常に優れており、感染症に対して患者の体内で治癒に貢献した抗体そのものに匹敵する性能の抗体をin vitroで人工的に作り出すには多大な労力を必要とする。一方、癌特異抗原に対して特別に成熟を起こした抗体が患者体内に存在する証拠はない。

### 様々なモノクローン抗体単離の技術

治療用抗体単離の前に、より一般的議論から始める。様々な分子(主としてタンパク質)に対して特異的に結合する抗体を入手したいというニーズは高い。混合物の中で標的分子を選択的に同定する試薬として抗体は最も優れており、一般性も高い。精製抗原を有しており、それに対して動物が免疫原性(immunogenicity)を示すという条件を充たせば、動物を抗原で免疫することによりポリクローン抗体の形で抗血清が得られる。最近筆者らは、その抗原の中の抗体によって認識される構造(エピトープ)が幾つあり、それぞれのエピトープに対して何種類の抗体が産生されるかは動物の免疫容量(具体的には、個体あたりのBリンパ球の総数)に大きく影響されることに気付いた。当然のごとくウサギ>ラット>マウスの順である。抗血清の中に含まれる抗体をモノクローン化したい時、従来法では脾臓細胞を癌細胞と融合してハイブリドーマを確立した後、目的とした性質の抗体を分泌している細胞を選別してクローン化する。未だ広く一般化されて使われている訳ではないが、脾臓細胞からファージ抗体ライブラリーを作製した後、スクリーニングにより目的とする性質の抗体を単離することも可能である。この方法は、動物種を問わずに適用できる。ニワトリ、ヒトを含めて抗体をつくる全脊椎動物種で可能である。

細胞融合によるモノクローン抗体作製技術をヒトに応用できないか、多くのグループが試みた。最近ヒトで細胞融合可能なミエローマ株を確立したKarpasによれば、マウスでハイブリドーマ作製が可能になった原因の一つは、M.Potterが確立したmineral oilを腹腔に注入してミエローマの発生を誘発する技術(MOPCと呼ばれたミエローマ株)で得られた細胞は、真の形質細胞(小胞体が非常に発達している)ではなく、細胞分裂速度が速い。一方、通常のヒトミエローマは増殖速度が数倍遅く、そのことが細胞融合株を得にくい真の原因だったと報告している<sup>9)</sup>。

より一般的に考えるならば、ある性質をした抗体が動物の血清中に存在するとすれば、その抗体を産生した抗体産生細胞も存在する。対象とする抗原で動物を免疫する操作は、使用者にとって都合の良い性質をしたその抗原に対する抗体を動物の中に作り出す過程であり、その抗体産生細胞の存在数を高める効果をもたらす。モノクローン抗体を作製することは、その細胞

を如何に効率的に不死化して選別するかの問題である。最近、セルソーターを用いて1個の細胞を分別する技術が確立している。蛍光標識抗原を用いてその抗原に結合する抗体産生細胞を1細胞化したのち、EBウイルスで不死化する、または、one cell PCR法で抗体遺伝子を単離することが可能になった。筆者らは後者の技術を確認したが、性能の良い(結合力の強い)抗体を得られていない。この経験を通して筆者は以下のように考えるようになった。モノクローン抗体を得る技術は既に数多くある。細胞融合によりマウスモノクローン抗体を得る技術が一般化し大成功している理由は、抗原で免疫した動物(マウス)の体内で、その抗原に対する性能の良い抗体を産生している細胞数が全Bリンパ細胞( $10^8$ - $10^9$ )の中で占める率が十分に高く、プラクティカルな意味で細胞融合により不死化可能な細胞(この総数は限られているはずである)の中に含まれているからである。その点からみて、ヒトのようにマウスの1000倍以上の免疫容量を持つ免疫系を対象としてマウスと同じ細胞融合法で性能の良い抗体をモノクローン化可能であろうか。まして、セルソーターで1細胞化した場合は、実際は全Bリンパ細胞のほんの一部を対象にしているにすぎないのではないか。上記方法で結合力の低い抗体しか得られなかったのはそのためであろう。それと比較して、 $10^{10}$ - $10^{11}$ の独立したクローンを対象にできる抗体ライブラリー技術は、in vivoでのヒト抗体レパートリーをカバーするのに適している。そこで問題は、十分に大きな抗体ライブラリーを作製した後、如何にして目的とする性質の抗体を得るか、スクリーニング法の開発が重要である。

### 治療用抗体単離戦略(総論)

既に10を越える治療用抗体が市場に出ているが、全てキメラ抗体かヒト化抗体である。ヒト抗体を作るには、ヒト抗体を作るトランスジェニックマウス(Abgenix社およびキリンとMedarex社共同開発)を用いる<sup>6)</sup>、またはファージヒト抗体ライブラリー(CAT社がWinterII特許およびMcCafferty特許と呼ばれる基本特許を有している)を用いる必要がある(図3)<sup>7)</sup>。両技術とも確立して既に10年以上経過している。これらの技術を用いて作製されたヒト抗体が、既に臨床試験の最終段階に達している例も幾つかあると報告されている。筆者は、将来的に

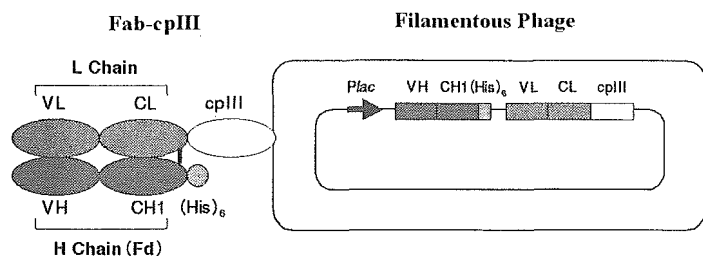


図3. ファージ抗体の模式図

M13ファージのような線状ファージを用いて粒子を構成するタンパク質(cpIIIを用いることが多い)と抗体(ここではFab型を例に示す。VH-リンカー-VLからなるsingle-chain Fv抗体が使われる)を融合させて抗体を発現させる。ファージゲノムが抗体遺伝子を有するので1個のファージが1個の抗体産生細胞に相当する。

は治療用抗体が全てヒト抗体として単離調製されることになるかと予想している。しかし一方で、そこまで一般化された方法にするには、未解決の技術が残っていると感じている。その点についてこの節で議論する。

抗原で免疫した後、動物体内で成熟抗体が作られるプロセスは実に優れている。これは変異の導入と親和力の高まった抗体産生細胞の選別がカップルしていることにより可能となる。in vitroでこのプロセスを再現するのは非常に困難である。(in vitroでは変異の導入とクローンの選別を別々に実施しなければならない。)そこでヒト抗体を作るトランスジェニックマウスを用いると、優れた性能の治療用抗体作製が可能に思える。しかし個体あたり $10^8$ - $10^9$ のBリンパ球から構成されるマウス免疫系が1000倍以上のBリンパ球を持つヒト免疫系をどの程度反映したものになるか、筆者は非常に興味を持っている。とりわけ抗体V領域の中で最も多様性の高いH鎖CDR3がマウスとヒトとは大いに異なる。D遺伝子の数と配列の多様性、更にN配列の平均鎖長も両者で大きく異なり、結果としてマウスでは多様性の程度はヒトと比べて低い<sup>8)</sup>。逆に言えば、マウスではCDR3の多様性を高めても結局それを生かし切れない。

既に記述したが、血清中に優れた性能の抗体が存在すれば抗体ライブラリー作製を通してモノクローン化できる。ヒトを対象とした場合に、抗体保有者がボランティアとして成分採血に協力してくれるとこれが可能となる。筆者らのグループでは血液3L相当( $10^{10}$ 程度のリンパ球を含む)を得て、 $10^{10}$ - $10^{11}$ の独立したクローンからなる抗体ライブラリーを作製して目的を達成している。この方法を広く用いようとした際に未だはっきりしていない点は、ウイルスや病原菌毒素に関してワクチン接種により誘導されてくる抗体と、実際に感染した結果作られる抗体が同質かどうかについてである。通常の感染では、抗原濃度が感染後次第に高くなり、抗体の出現と共にピークを過ぎて減少する。通常のワクチン接種では、最初から高濃度であり次第に減少する。免疫応答系の成立プロセスを考えた時に、全く同じレスポンスが起こる訳ではないと予想される。ウイルス生ワクチンが不活化ワクチンより有効な点もこのことの反映と推定される。

筆者の研究室では、数10名のボランティアのBリンパ球に富む組織(臍帯血、扁桃、骨髄、末梢血)から作製した巨大なヒト抗体ライブラリー(antibodies for intended multiple screeningを略してAIMSと名付けた)を利用して既に数多くの抗原に対する抗体を単離している。このような一つの巨大な抗体ライブラリーを、様々な抗原に対する抗体のマスターソースとして利用する方法についても各論の中で記述する。

### 治療用抗体単離(各論)

#### 1. 感染症(ウイルス)

筆者らは、今までに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型肝炎ウイルスの中和抗体単離を試みた。その経験に基づいてウイルス感染症に対する治療薬もしくは予防薬としての抗体単離法を論じる。ウイルスは宿主となる細胞と同じ細胞膜に取り囲まれてウイルス粒子を

形造っているものと、ウイルスゲノムにコードされたタンパク質からなる殻が剥きだしになってその中に核酸（DNAまたはRNA）を含むタイプがある。いずれの場合も、外皮に存在する特定のタンパク質〔インフルエンザウイルスではヘマグルチニン（HA）〕が宿主細胞膜上の特定分子を受容体として結合することから感染が開始する。その後、ウイルスの種類によって幾つかの異なる感染経路が存在するが、最終的にウイルスゲノムが宿主細胞の細胞質内さらには核内まで到達して、ゲノムの複製が起こり、更にウイルスタンパク質が合成される。細胞内で増殖したウイルスは、ウイルス粒子として細胞外に放出されたのち、周囲の未感染細胞に再感染して拡散する場合と、粒子が細胞外に出ることなく細胞間での融合（syncytiaの形成）を通して感染拡大を実現するタイプがある。ウイルスに対して中和活性を示す抗体は、ウイルスが宿主細胞に感染する時に機能する上述したウイルス粒子外皮分子の特定部分（中和エピトープ）に結合する。ウイルス感染細胞が未感染細胞と融合する場合も、このウイルス由来分子は感染細胞膜上に発現しており、融合を仲介する。中和抗体は、このウイルス分子と受容体の結合を物理的に阻止する機能を示すことで、ウイルスの感染能を失わせる。1個のインフルエンザウイルス粒子には1000個のHA分子が存在し、1ウイルス粒子あたり中和抗体が約30個結合するとウイルス感染が阻害される。抗体量と中和能の相関関係を解析すると、“one hit curve”（抗体濃度を2倍にすると、2倍のウイルスが失活する）が得られる。これらの古典的実験結果は、HA分子の中に約1/30の率でそこに抗体が結合するとウイルスの感染能を失うcriticalな部位があることを示唆しているが、ウイルス失活の詳細な分子機構は明らかにされていない。中和活性を示す抗体とHAの複合体の立体構造解析は、HA分子の中で受容体と結合する部分が中和エピトープであることを示しており、抗体がHAと受容体の結合を阻害することを示す。

VZV、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、いずれの場合もAIMSライブラリーから強力なウイルス中和活性を示す抗体が複数個得られた<sup>9)</sup>。詳細な解析をした結果、得られた抗体はヒト体内でウイルス中和抗体として機能した分子そのものであると判断された。AIMSライブラリーは数10名のヒトのBリンパ球由来であるが、この3種のウイルスは多くのヒトにとって感染経験があると予想され広く存在するものである。この研究結果を通して幾つかの点が明らかになった。1) 強いウイルス中和活性を示す抗体はウイルス粒子上または感染細胞膜上の分子に強く結合できるが、その分子を可溶化すると抗体との結合性が極端に弱まる。換言すれば、中和エピトープを有するウイルス分子の立体構造は、可溶化により壊れやすい。2) 抗体はH鎖とL鎖が1組となって抗原特異性が決まる。しかし抗体ライブラリーを作製する際には、多数のBリンパ細胞から集団のままmRNAを抽出し、H鎖およびL鎖はそれぞれ別々にライブラリー化したのちランダムに組み合わせて巨大ライブラリー化する。そこで抗体ライブラリーをスクリーニングしてもin vivoに存在した抗体を真に反映した組み合わせからなるものが得られない危惧があった。しかし、in vivoで成熟した抗体を産

生する細胞は相対的に増えていること（その結果、その成熟抗体をコードする遺伝子の転写物も相対的に多い）、L鎖レパートリーの大きさは数百種類程度と比較的小さいことから $10^{10}$ - $10^{11}$ のクローンからなるAIMSライブラリーからはin vivoで機能した抗体を単離できる（図4）。

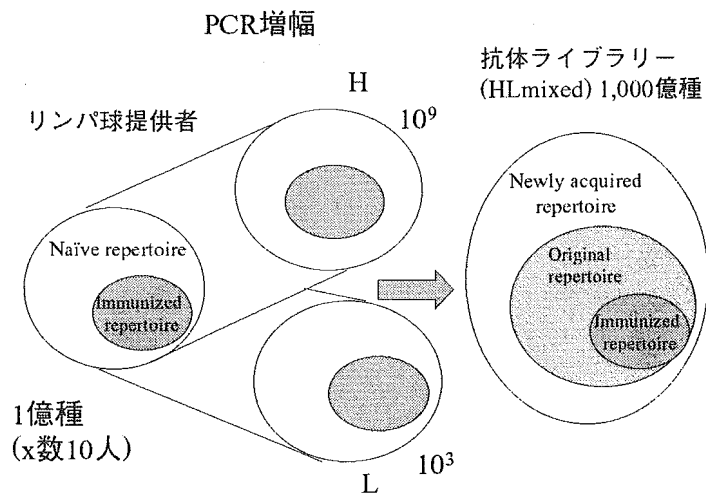


図4. 抗体レパートリーの相関関係

ヒト体内では抗体はナイーブレパートリーと成熟抗体レパートリーからなる。抗体ライブラリー作製に際しては、H鎖L鎖それぞれを別々に増幅させたのち、組み合わせて作製する。

単離したVZV中和抗体は、その中でもとりわけ中和力の強い2種類について臨床試験を開始できる段階にある（図5、図6）。ロタウイルスの場合は、幾つかの型が存在するが、中和可能な型の異なる3種類の抗体を混合することで殆ど全ての型のウイルスを中和できる。共同研究者である谷口のグループは、動物実験で経口投与することにより大腸性下痢を予防できることを示した。インフルエンザウイルスに関しては、毎年のように起

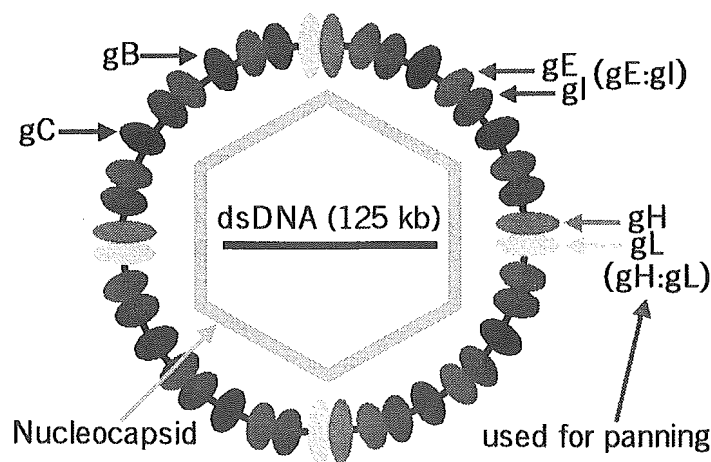


図5. VZV粒子の構造

VZV中和抗体単離に際しては、表面タンパク質であるgH:gL複合体を抗原として用いた。

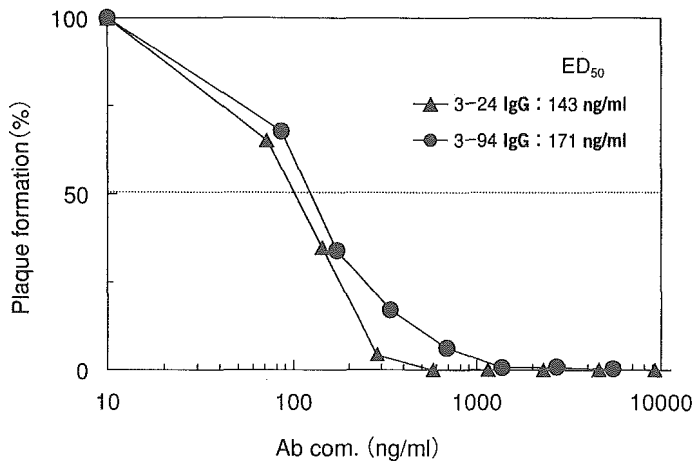


図6. VZV中和抗体のウイルス中和力  
3-24, 3-94 IgG型抗体は、非常に強い中和力を示す。

この抗原性の変化 (antigen-drift) の問題があり、単離した抗体も種特異性 (strain-specificity) が高い。そこで抗体を治療薬として開発するには、中和可能な範囲がなるべく広い抗体単離のための工夫が必要となる。B型肝炎ウイルスに関しては、筆者のグループでは未だ中和活性を示す抗体単離に成功していない。

## 2. 病原菌毒素

病原菌毒素に関して、ジフテリア毒素 (DT), 破傷風毒素 (TT), ボツリヌス毒素に対する中和抗体単離を試みた。DT, TTは百日咳毒素 (PT) と共に日本人では幼児期に3種混合ワクチン接種を受けている人が多く、AIMSライブラリーの中に中和抗体が含まれていることが予想された。その期待通り、DTおよびTTに対して強く結合する抗体が多数単離された。単離された抗体はそのアミノ酸配列に基づき分類できる。とりわけH鎖CDR3の塩基配列が完全に一致する、もしくはわずかの変異導入で説明できる関係にある場合は、同一人物由来で更に1個の抗体産生細胞が増殖し、変更を導入された産物と推定できる。DT, TTそしてインフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) に対して得られた抗体集団について、次のような共通点が観察された。それぞれ明らかに特定の数個のBリンパ球由来の抗体で、様々な異なる部位数個に変異が導入されたと推定される多数の抗体集団が得られた。DT, TTの場合、その抗体の抗原結合力は極めて強い ( $K_d=0.1-1nM$ )。DTに関しては、Vero細胞を用いて毒素の細胞への吸着、侵入、酵素活性のどの段階を抗体が阻止するか解析すると、吸着を阻止することが示された。更にウマ血清やヒト血清 (両方ともポリクローン抗体) の毒素中和抗体価測定系を用いて解析したところ充分強い中和活性を示すクローンが含まれていた。上述したウイルス中和抗体の場合は、得られた多種類の中和抗体を相互比較してみても変異導入で説明できる単一Bリンパ球由来と考えられる組み合わせの抗体は得られていない。そこでDT, TT, NPに対する抗体の性質 (中和活性を示すものと示さないもの両方が共存している) は、複数回 (DTPワクチンでは通常4回) のワク

チン接種により産生が誘導された抗体の特徴ではないかと推定している。ウイルスが感染した場合は、中和力の強い抗体を産生できるようになった少数の細胞が選別されるしくみがある。トキシイドワクチン (NPはインフルエンザワクチンに大量に含まれていることから同じ現象が起こった) を何回か接種すると、抗毒素抗体産生が誘導されその結合力は高まる (成熟した抗体が出現する) が、中和活性の強弱による特定のクローンの選別が働かない。将来的に毒素中和薬としてモノクローン抗体を用いる場合に、本来ポリクローン抗体である抗血清の力価測定系をそのままモノクローン抗体検定に用いてよいか、今後の検討課題である。ウマ抗血清で用いられている力価をモノクローン抗体で達成しようとするグラム単位で患者に用いることになる。経験的に  $K_d=0.1-1nM$  より強い結合力を示す抗体は通常期待できない。AIMSライブラリーをスクリーニングする際に、トキシイド (ワクチンとして用いるためにトキシンをホルマリン処理して無毒化したもの) でなくトキシンを抗原に実施したが得られる抗体の性質に大差なかった。

ボツリヌス毒素に対する中和抗体単離も筆者のグループで成功しているが、その詳細は解析中である。

## 3. ヘビ毒

ハブやマムシのような毒を持つヘビに咬まれた場合、従来より抗毒素抗体を高濃度に有するウマ血清を治療に用いている。ウマ血清は特効薬であるがアナフィラキシーショックを含めた様々な副作用が問題となり、ヒト抗体に変更したいという強い医学的要請がある。そこで筆者らは抗ハブ毒中和抗体単離を試みることにした。ヘビ毒は多成分からなる混合物であるが、ハブの場合は出血因子 (HR-1, HR-2) が同定、精製されているので最初の標的として抗HR-1, 抗HR-2抗体単離を試みた。最初AIMSライブラリーを用いたが、得られたHR-1とHR-2に結合する抗体は弱い結合力を示すが毒素中和活性を持たなかった。共同研究者である野崎博士が、「長年にわたってハブを飼育しハブ毒の抽出精製を担当している人 (この人は生涯で5回ハブにかまれている) を紹介しましょう。その人が成分献血 (リンパ球画分) をしてくれるので、それを材料にして抗体ライブラリーを作製してはどうか」と提案された。このアイデアは素晴らしかった。あるヒトの血清中に特定の抗原に対する抗体が含まれていることが判明した場合に、その抗体を産生している細胞を確実に回収する方法はこれまで確立していなかった。その細胞が体内のどの部分に存在するか定かでない。しかし成分採血という手段をとると、全身に散在するBリンパ球全てのレパトリーを反映した多数の細胞を得ることが可能で、その中には目的とする細胞が確実に含まれている。作製したライブラリーの中には抗HR-1抗体, 抗HR-2抗体, 更には様々なハブ毒に含まれる成分に対する抗体が含まれていた。そして抗HR-1抗体は、強い毒素 (出血) 中和活性を示した。この抗体は臨床試験を開始すべき段階にある。この研究により、特定の性質をした抗体を有する人がボランティアとして成分採血に協力してくれるなら、その抗体をモノクローン化する技術が確立した。

#### 4. 癌

筆者の研究室では、厚生労働省研究費に支えられて以上のような様々な感染症に対する中和抗体を単離するプロジェクトを実施した（している）。同時に、平成11年度から5年間、文部科学省科学技術振興調整費によるゲノムフロンティア開拓研究として「ポストゲノム時代のタンパク質機能解析ツールとして抗体を利用する方法の開発」を行った。そのプロジェクトの中で線虫（*C.elegans*）母系遺伝子約800種の発現パターンをタンパク質レベルで解析する試薬として抗体を調製した。ゲノムサイエンスは、多数の対象を網羅的に扱うことを特徴とする。このプロジェクトを立案した頃には、AIMSライブラリーにどのような抗原に対しても特異的に結合する抗体が必ず含まれていると確信していた。そこで多数の抗原に対してAIMSライブラリーを抗体のマスターソースとして用いることにより、一網打尽に抗体を単離できると予想した。研究を続ける中でこの考えの甘さ（抗体ライブラリーの中に目的とする抗体が含まれることと、それを単離できることは別問題である）が明らかになったが、解決法を模索する中で新しい展望が開けた。

抗原を用いて動物を免疫すると、その動物の中に出現する抗体は、免疫応答成立過程で起こる様々な現象の産物である。例えば抗原はアジュバンドと共に免疫する、小分子（ハプテン）はタンパク質（キャリアー）に結合させる必要がある、体内に導入された分子は、様々なプロセッシングを受ける等。それと比較して特定抗原を用いて抗体ライブラリーをスクリーニングする操作は抗体が得られる原理が全く異なる。ファージ粒子上に存在する抗体が用いた抗原と物理的に抗原抗体複合体を作り、洗浄プロセス（複合体を作らなかったファージや、非特異吸着したファージを除くために必要）でその複合体が破壊されなかったファージ粒子（抗原抗体反応は平衡反応であるので、複合体形成反応と解離反応が同時に起こっている。洗浄すると解離反応のみが起こり続けることになる）のみを回収することができる。この単純な事実気付くのに長期間の悪戦苦闘を必要とした。上述したVZVの例では、精製抗原（gH:gL複合体）を用いてAIMSライブラリーをスクリーニングして得た中和抗体がELISAでは弱い結合力しか示さないのに、その抗体の単離に成功した。一方、ELISAでは強い結合力を示す抗体がウイルス中和活性を示さなかった。何故このようなことが起こったかを推定すると、AIMSライブラリーの中にVZV中和抗体が多数存在したからである。スクリーニングに用いるパニング法とELISAは、本質的に同じ原理に基づいておりプラスチック表面に抗原を付着させてその後抗原-ファージ抗体複合体を作らせる。中和活性を示さないがELISAで強い結合力を示す抗体が多数存在するとすれば、それらのみが得られたはずである。このような研究の紆余曲折の中で、ファージ抗体ライブラリーを上手に利用する上で最も重要な点に気付いた。「ファージ抗体ライブラリーは、単離した抗体を使用する時点で対象とする抗原が形作っているであろう立体構造をそのまま反映した抗原を用いてスクリーニングするのが、使用目的に合致した性質の抗体を得る上で最適である。」「抗原抗体反応は平衡反応である。

AIMSライブラリーは、どのような抗原分子に対する抗体もほぼ確実に含んでいる。そこで抗原とファージ粒子集団を混合すれば、一定頻度で必ず複合体ができているはずで、スクリーニング法として洗浄プロセス（複合体が破壊される段階）を経ることなく複合体を単離する方法を開発しよう。」

in vivo抗体レパートリーに二重性があることは上述したが、AIMSライブラリーはそれを反映した抗体レパートリーの構成になっている。多くの人が感染-発病-治癒の経験があると予想される疾病に対する中和抗体単離の成功例は既に記述したが、残りの大部分のナイーブレパートリーを構成する抗体の利用法が問題であった。ゲノムプロジェクトとして多数の抗原に対する抗体のソースとして用いる試みは、調製した抗原がナチュラルな立体構造をしていないことがネックとなって挫折した。治療用抗体の対象となり得る疾患を想定してみる。薬剤として体内に投与された抗体は、通常の状態では分泌分子もしくは細胞膜上に発現した分子に結合する。そこでサイトカインやそのレセプターまたは癌特異抗原が治療用抗体の標的と考えられ、現在、開発が進められている。そこで筆者らは発想を大転換し、特定の既知抗原を標的として抗体を単離するのではなく、標的抗原を捜すために抗体ライブラリーを用いるという考えに到達した。より具体的には、癌細胞膜上に存在する事実上全ての分子（エピトープ）に対する抗体を網羅的に単離する。続いてその抗体を用いた組織染色により癌細胞特異的な染色パターンを示す抗体を探し出す。抗体を用いた免疫沈降（IP）またはアフィニティークロマトグラフィーにより抗原を精製し、マズスペクトロメーター解析によりその抗原を同定するというのが基本戦略である。このアイデアの最も根幹をなす「細胞膜上の全てのエピトープに対する抗体を単離する技術開発（図7にスキームを示す）」にはほぼ2年前（平成14年秋）に成功した。

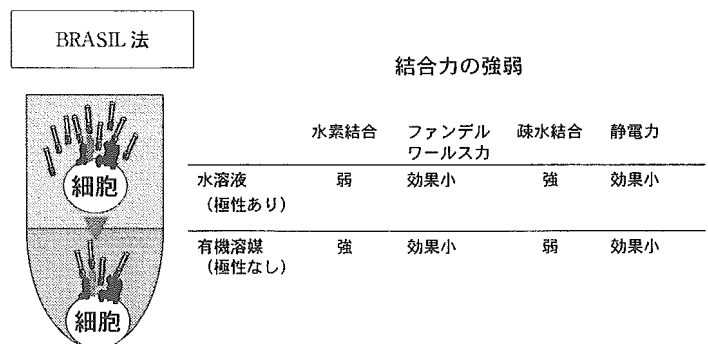


図7. 細胞上の抗原に対する抗体を網羅的に単離する原理

水溶液中で細胞と抗体ファージを混合し、遠心法によって抗原抗体複合体を細胞と共に有機溶媒層下に沈殿させる。水溶液の環境から有機溶媒への変換で水素結合が強まり、多数の抗体を洗浄過程を経ることなく回収できる。

癌治療用抗体はハーセプチンとリツキサン成功例があり、開発の参考となる。最初、肺癌および乳癌でHer2遺伝子を含むDNAが増幅していることが発見され、Her2遺伝子の異常大

量発現が発癌の原因であることが示された。このHer2タンパク質を標的とするヒト化抗体がハーセプチンである。Bリンパ細胞は全てCD20分子を発現している。リツキサンは抗CD20マウス/ヒトキメラ抗体であり、非ホジキン型Bリンパ腫の治療薬として使われるリツキサンは、腫瘍細胞のみを殺す訳ではなく、正常B細胞を含めた全てのCD20発現細胞が殺される。しかし、治療後正常Bリンパ細胞は、造血幹細胞の分化によって再生するので治療中の感染症対策を充分に行えば副作用の問題は解決できる。この2例に示されるように従来型の創薬コンセプトは、標的探索がそれまで知られた事実に基づき論理的である。しかしゲノムサイエンスがもたらした膨大な情報量に基づくゲノム創薬が抗体分野に持ち込まれた。

典型的なアプローチが、基本的にヒト全遺伝子を解析できるDNAマイクロアレイを用いた転写物の網羅的解析法で、癌細胞由来のmRNAと正常細胞由来のmRNAを対象に、質的または量的差を示す遺伝子を見出す方法である。データの多くは公表されていないが、間違いなく世界中で多くのグループが試みており莫大なデータが蓄積されていると推定される。そしてその中から各癌ごとに10数種を越える癌特異抗原が抗体標的候補として挙げられているであろう。

筆者の研究グループでは全く別のアプローチをとっている。肝癌を例にすれば、様々な肝癌由来細胞を抗原にして既に2000種を越える細胞膜上分子に結合するモノクローン抗体を単離した。それをプローブにして手術除去した肝癌組織の切片を用いた免疫組織染色を行い、八百数十例の抗体の中で数10種類が癌組織特異的染色像を与えることを見出している(図8)。その中で癌治療用抗体の候補となり得る条件は、(1)抗体によって認識される抗原が、何故癌特異抗原となっているか、質的および量的視点から説明できる、(2)IgG化した抗体が、標的抗原を発現する癌細胞に対してADCC[antibody-dependent cell cytotoxicity:細胞膜上で抗原抗体複合体が形成されると、ナチュラルキラー(NK細胞)等がそれを認識して細胞を殺す因

子を分泌する]による致死効果を示す、(3)手術除去した癌細胞のヌードマウス(またはSCIDマウス)中での増殖をIgG抗体が抑制する。

DNAマイクロアレイを用いたアプローチおよび筆者のグループのアプローチを遂行する中で抱えている現段階での最大の問題は、候補となり得る抗原数もしくは抗体数が多すぎてIgG化が追いつかない点である。更に動物を用いたモデル実験を前臨床試験と位置づけるとすれば、ヒトを対象とする臨床試験実施には、1抗体についてGMPおよびGCPレベルで必要量調製するのに最低2-3億円必要と推定されており、この問題を如何に乗り越えるか道を見出さないと「宝の持ち腐れ」となってしまう。

以上の2方向からの網羅的アプローチが癌治療用抗体単離に結びつくとすれば、癌に対する抗体を用いたテーラーメイド医療が現実のものとなる。その場合最大の問題は、抗体調製に要する莫大な費用をどうするかとなり、安価な抗体調製法の開発が求められている。

## 抗体治療薬開発可能分野

### 1. 自己免疫疾患

TNF $\alpha$ に対する抗体(レミケード)が、関節リウマチに劇的な治療効果をもたらすことが示されている。サイトカインは数多く同定されているが、ネットワークを作っており、その最上流に位置するTNF $\alpha$ やIL-1の働きを抑制するとその下流にある多くのサイトカインの働きも抑制され、免疫系の異常亢進が原因である自己免疫疾患に治療効果をもたらすと考えられている。ここで議論しようとするのは、そのような原理に基づく抗体治療薬ではなく、自己抗原に対する抗体の出現が発病の原因と推定されているが、その抗原の実態がわからない各種自己免疫疾患に関してである。例えば、「高安動脈炎」等の血管炎は、血管内皮細胞の特定分子に対する抗体の出現が原因である可能性が高い。「川崎病」では $\gamma$ グロブリン大量投与により冠動脈瘤の形成を阻止できるが、その際 $\gamma$ グロブリンの中の何かが特定抗原の機能を抑制しているかもしれない。ヒトゲノムシーケンスが完了し、全ヒト遺伝子総数が予想以上に少ない(2万-2万5千)ことが判明した。細胞膜タンパク質がそのうちの20%としても4-5千種となる。筆者らの研究グループではこの全膜タンパク質に対するモノクローン抗体単離が現実的に可能な課題であると考えている。その抗体をセットとして準備し抗体チップを作製すれば、今まで未同定だった様々な抗原もしくは自己抗体を結果として単離できる。今後難治性疾患として患者数の増大が予想される自己免疫疾患の治療法の道を開くと推定している。

### 2. 神経変性疾患

アルツハイマー病、クロイツフェルトヤコブ病、更にハンチントン病を代表とするポリグルタミンを原因とする各種神経変性症は、全てタンパク質凝集体の形成と神経細胞死が密接に関係(一部因果関係も示されている)する病気と推定されており、

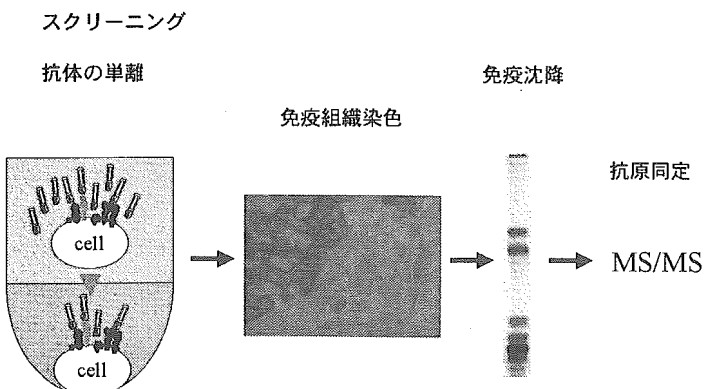


図8. 癌特異抗原の同定と癌治療用抗体単離の方法

1) 癌細胞を抗原にして膜タンパクに対する多数のモノクローン抗体を単離する。2) 手術除去した癌細胞に対する免疫組織染色で癌特異的染色像を与える抗体を選別する。3) 抗体を用いた免疫沈降で、抗原を分離する。4) マススペクトロメーターによる解析で癌特異抗原を同定する。



現在治療法が存在しない。動物実験レベルではこの凝集体形成を阻害する抗体投与またはその抗体産生を誘導するワクチンに治療効果があることが報告されている。本格的に抗体治療が行われるのは遠い将来と思われるが、抗体開発の対象疾患として巨大ジャンルである。

## 展望

本総説は7年余にわたって各種疾患治療薬としてのヒト抗体単離を実施した筆者が、現時点(平成16年秋)で考えるこの分野の概観である。薬は、小分子からなり経口投薬可能なものがより望まれる。注射を必要とし高価な抗体が長期に渡って薬の主役となるのは想像し難いが、今後10-20年間、創薬の重要な一角を占めるのは間違いない。本小文では、筆者らのグループで用いているファージ抗体ライブラリーを基本技術としたヒト抗体単離調製戦略を中心に論じているが、その技術的詳細は書いていない。技術的なことについては既に幾つも実験書が出版されている。ファージ抗体ライブラリー作製には基本特許が存在し、その特許料が高額に設定されていること、一方で大学院生を研究グループの核とする小グループがアカデミック研究を進める技術としては多くの単純労働を必要とする点から向いていない、等の理由でその高いポテンシャルと比較して技術的発展が遅れた分野である。筆者のグループでは10数名の人が数年にわたって本プロジェクトに取り組み、本文で記述したような結論に到達した。詳細に読んで頂くと、何が問題であり如何なる点を考慮すべきかご理解頂けると思う。筆者はCAT社の特許が終了した後は、ファージディスプレイ技術を用いる研究者が飛躍的に増加し、ゆくゆくは現在の細胞融合技術を凌駕すると確信している。本文がファージ抗体ライブラリーの可能性を正しく予言したものであれば幸いである。

## 謝辞

本総説は藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門で実施されている「抗体プロジェクト」の成果に基づいて書かれているが、多くの共同研究者の協力による。AIMSライブラリーは赤堀泰、伊庭善孝、森野和彦、篠原みどりの4名が作製した。VZV中和抗体単離は富山医科薬科大学医学部・白木公康教授との共同研究で、鈴木和宏、赤堀泰が担当した。ロタウイルス中和抗体単離は本学谷口孝喜教授との共同研究でウイルス学教室の守口匡子が実施した。ジフテリア毒素および破傷風毒素の中和抗体単離は国立感染症研究所の高橋元秀博士との共同研究で柿田麻衣が担当した。ボツリヌス毒素中和抗体単離は同じく高橋元秀博士との共同研究で東成見が担当している。インフルエンザウイルス中和抗体単離は大阪公衆衛生研究所・奥野良信教授との共同研究で廣野ゆかり、岡田潤が担当している。ハブ毒中和抗体単離は沖縄衛生研究所の野崎真敏博士との共同研究で東成見が担当している。抗癌抗体研究は本学医学部消化器外科の杉岡篤助教授、森田美和研究員と我々のグループとの共同研究として開始し、現在は以下のメンバーが参加している。医学部(杉岡篤、森田美和、宮川秀一、星長清隆、白木良一、

溝口良順、加藤良一)、黒澤研究室(赤堀泰、伊庭善孝、濱田進、黒澤仁)、COE関係(住友万里子、村松千穂、松田一起、江口恵子)。自己免疫疾患については本学吉田俊治教授との共同研究で、三浦恵二、玉熊桂子が担当している。このように多数のメンバー参加による巨大プロジェクトとして実施されている。更に本研究は、プロジェクト開始当初から(株)医学生物学研究所(MBL; 数納幸子会長、西田克彦社長)の全面的支援を受け、平成11年5月には治療用ヒト抗体開発を目的としたベンチャー会社、(株)抗体研究所(IFA)がMBLの子会社として設立された。現在9名の研究者がIFAに所属して黒澤研究室で共同研究を実施している。

## 引用文献

1. Koehler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-497.
2. Kameyama K, Imai K, Ito T, Taniguchi M, Miura K, Kurosawa Y. Convenient plasmid vector for construction of chimeric mouse/human antibodies. *FEBS Lett* 1989; 244:301-306.
3. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185 HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:4285-4295.
4. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581.
5. Karpus A, Dremuccheva A, Czepulkowski BH. A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98: 1799-1804.
6. Medez MJ, Green LL, Corvalan JRF, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Frickson KL, Luna J, Ray CMN, Abderrahim H, Kirshenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jabovits A. Functional transcript of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nature Genet* 1997;15: 146-156.
7. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenbom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:433-455.
8. Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa K. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J.* 1988;7:4141-4150.
9. Higo-Moriguchi, K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, Taniguchi K. Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus. *J. Virol.* 2004;78:3325-3332.

ISO 規格準拠

---

# 医療機器の滅菌 及び滅菌保証

---

ISO Standards on Sterilization and  
Sterility Assurance of Medical Devices

編集委員長

佐々木次雄

監修者

新太喜治 上寺祐之 武久正昭  
永井 勲 中田精三 山際裕一

日本規格協会

# 薬事法改正及び医療機器規制，並びに ISO/TC 198 活動の概要

## 第1章

guidance for ISO/TC 198 chapter 1

### 1.1 医療機器の品質保証と ISO 13485

2002年の薬事法改正に伴い，2005年より医療機器の製造に適用されるGMPはQMS（Quality Management System：品質マネジメントシステム）と名を変え，医療機器に関する国際的な品質保証基準であるISO 13485が全面的に適用されることになる。医療機器に関する品質保証基準の変遷とその特徴を概説する。

#### 1.1.1 薬事法改正と ISO 13485

40年ぶりの薬事法大改正における主な改正点は，①医薬品以上に多様な技術・素材が用いられる医療機器の特性に対応した，医療機器にかかわる安全対策の見直し，②生物由来製品の安全確保に向けての法的整備，③市販後安全対策の充実と国際整合性を踏まえた製造承認制度の見直し，④特殊法人改革等を踏まえた承認審査体制の見直しである。改正薬事法においては，製造販売業者（元売業者）に適用されるGQP（Good Quality Practice：製造販売業の品質管理規則）とGVP（Good Vigilance Practice：安全管理規則）と，製造業者に適用されるQMSが省令として制定される。この中で，QMSは全面的にISO 13485:2003（医療機器—品質マネジメントシステム—規制目的のためのシステム要求事項）を採用したものとなり，製造販売業者はGQPの中で，QMSに従った製造が行われることとその管理を行うことを求められる。従来の業許可の際に受けた官庁によるGMP審査は，品目製造承認審査の中でQMS適合性がチェックされることとなる。設計管理等についても，同様に設計部門への調査が行われる。また，体外診断薬については，国際的な規制にあわせ医薬品GMPではなく，医療機器QMSが適用されるようになる。

#### 1.1.2 医療機器に関する改正薬事法の特徴

##### 1.1.2.1 業許可区分

###### (1) 製造販売業

① 医療機器の品質・安全確保に関する承認取得者の責務を明確にするため，また企業体制の変化等に対応した薬事制度とするために新たに設定された許可制度（ライセンス・ホルダー）。

② 総括製造販売責任者を置く。

③ 市販後安全管理と製品の品質保証管理の両体制の確保が必要。

GQP 製造販売品質管理基準

（Good Quality Practice）

GVP 製造販売後安全管理基準

（Good Vigilance Practice）

④ 更新は5年，業許可の主体は都道府県。

###### (2) 製造業

① 製品の区分ごとの申請。

② 5年更新，業許可の主体は区分により，都道府県又は厚生労働省。

③ 責任技術者の資格要件は，従来どおり。

④ 個別の品目の製造方法，工程等は，許可の際ではなく，品目承認の際にGMP調査により適合状況を確認する。

###### (3) 販売業

① 医療機器クラスIII/IVは許可制となる。

② 業許可の主体は，都道府県，有効期限は6年。

③ 管理者には継続研修が必要。

④ 従業者に対して，情報提供及び品質確保に関する教育訓練を実施する。

⑤ クラスIII/IVの製品は，納品先記録（ロット管理を含む）を作成し，3年間保管。

##### 1.1.2.2 第三者認証制度

第三者認証制度は，改正薬事法施行後，クラス

IIの医療機器に適用される。認証基準は、国際整合推進、相互認証を可能とすることが目的である。基本要件としては、医療機器の品質システムISO 13485:2003への適合の有無を第三者認証機関が、審査を行って、判定する。

### 1.1.2.3 医療機器のリスクに応じたクラス分類

医療機器を、それらの用法・用途、使用リスクに基づいて、高度管理医療機器、管理医療機器、一般医療機器に区分している。

- ① 高度管理医療機器（現行：クラス3，クラス4）  
透析器，ペースメーカー，放射線治療装置等
- ② 管理医療機器（現行：クラス2）  
MRI，電子式血圧計，消火器カテーテル等
- ③ 一般医療機器（現行：クラス1）  
メス，ピンセット，X線フィルム等

### 1.1.2.4 その他

- ① 法制上の名称を医療用具から医療機器へ改称
- ② “体外診断用医薬品”制度の見直し
- ③ 高リスク医療機器の販売業を許可制にする
- ④ 生物由来製品の管理強化

## 1.1.3 医療機器の品質マネジメントシステム

### 1.1.3.1 品質マネジメントシステム

製造工程全般にわたった、十分な組織的管理のもとに、品質が高度に保証された医療機器を製造できる体制を確立して医療機器を製造すること。すなわち、GMPを行政的立場から初めて取り上げたのは米国で、1963年に制定、翌年から実施され、医療機器に関しては1978年12月に医療用具GMPが施行された。

わが国においても、1987年1月に薬務局長通知により医療用具製造業者への行政指導の基準として医療用具GMPが制定され、1993年に薬事法の改正が行われ、設計管理、苦情処理、回収処理、自己点検、滅菌工程のバリデーションを含む医療機器の製造業の許可要件と位置付けられることになった。

一方で国際標準化機構（ISO）は、製品そのものではなく、企業の品質保証体制についての要求事項を規定し、①経営者に至る責任と権限、②設

計管理、③文書化、④第三者による監査を規定した国際規格として、1987年にISO 9000シリーズを制定し、1994年7月、2000年12月に改正を行った。ISO基準を医療機器の品質システムに適用するためのガイドラインとして、EUは1993年10月に欧州規格（European Norm: EN）46000シリーズ基準を制定した。このEN 46000シリーズ基準がEUにおける医療用具GMPに相当するものである。

医療機器に関する国際規格制定のための専門委員会として1994年に発足したISO/TC 210は、先行して成立していた欧州のEN 46000シリーズ（1993年制定）をたたき台として医療機器に適用するために特別要求事項を付加するとともにリスク分析などを強化したISO 13485の原案をまとめ、1996年にセクター規格として制定した。

米国においては国際整合の中で医療機器品質システム（QSR）を1996年に発行し、デザインバリデーションの一部としてリスク分析を求めている。FDAの見解では“QSRはISO 13485:1996と整合している”としている。

また、EUは医療機器指令（MDD: 93/42/EEC）の中で基本要件としてリスク分析（EN 1441）を要求していた。またEN規格としてISO 13485を取り入れ（EN/ISO 13485:2000）、2004年3月をもってEN 46000シリーズを廃止とした。

わが国でも医療用具GMPを許可要件とする際に、国際的な基準と整合性を持たせることが必要と考えられ、ISOに基づいているEN 46001基準と整合性のある行政指導基準として“医療用具QAシステム基準（薬務局長通知）”が1994年12月に制定されている。

### 1.1.3.2 ISO 13485の2003改正

ISO/TC 210はISO 13485:1996の引用規格であるISO 9001:2000改正作業段階で、新規追加要求である“継続的改善”及び“顧客満足”の規定は規制になじまない、要求事項は現行規格と同等とするとの認識で、法規制に使用することを目的としてISO 13485の改正作業に入り、2003年7月15日に発行された。その特徴として、顧客満足、継続的改善の削除とISO 9001:2000で大