

- Solito E., *Hepatology*, **31**, 371—380 (2000).
- 31) Masaki T., Tokuda M., Fujimura T., Ohnishi M., Tai Y., Miyamoto K., Itano T., Matsui H., Watanabe S., Sogawa K., Yamada T., Konishi R., Nishioka M., Hatase O., *Hepatology*, **20**, 425—435 (1994).
- 32) Masaki T., Tokuda M., Ohnishi M., Watanabe S., Fujimura T., Miyamoto K., Itano T., Matsui H., Arima K., Shirai M., Macba T., Sogawa K., Konishi R., Taniguchi K., Hatanaka Y., Hatase O., Nishioka M., *Hepatology*, **24**, 72—81 (1996).
- 33) Adachi T., Nakashima S., Saji S., Nakamura T., Nozawa Y., *Hepatology*, **21**, 1668—1674 (1995).
- 34) Kim S. W., Rhee H. J., Ko J., Kim Y. J., Kim H. G., Yang J. M., Choi E. C., Na D. S., *J. Biol. Chem.*, **276**, 15712—15719 (2001).

バイオロジクスのトランスレーショナルリサーチ (その1)

最近医薬品を含めた医療技術開発におけるトランスレーショナルリサーチ (TR) の重要性が叫ばれ、様々な学会等でトピックとして取り上げられている。我が国の医薬品開発環境の最も大きな問題点の一つは、臨床研究環境の未整備であることは衆目の一致するところであるが、取り上げられる機会が多い割には、TRの要点についての理解は必ずしも深まってははいないように思われる。そこで本稿ではバイオロジクス、特に筆者の専門とするバイオテクノロジー応用医薬品 (バイオ医薬品) の開発を目指してTRを実施する上で考慮すべき点を、規制ガイドラインを参考に、2回に分けて考えてみる。

TRの本来の意味は、「探索的臨床研究=基礎的研究成果を臨床へ導入するための臨床開発の初期段階のプロセス」であるが、今現在本来の意味のTRを行う上での条件等を定めた公的なガイドラインはない。しかしTRの対象を治験レベルまで広げると、その実施の条件、および注意点は既存の各種ガイドライン等から浮かび上がる。

バイオ医薬品の中で既に最も実用化が実現している医薬品は、遺伝子組換え技術や細胞培養技術を用いて製造されたタンパク質性医薬品 (エリスロポエチン、インスリン類、成長ホルモン、インターフェロン、ヒトモノクローナル抗体等) であるが、我が国においてこれら医薬品開発にあたってまず参照すべきガイドラインは、(1)薬審第243号通知 (昭和59年3月30日) 「組換えDNA技術応用医薬品ガイドライン」; (2)薬審1第10号通知 (昭和63年6月6日) 「細胞培養技術応用医薬品ガイドライン」; (3)都道府県衛生主管部 (局)薬務主管課宛事務連絡 (平成元年5月) 「薬審1第10号通知に関する質疑応答」である。しかしその後、医薬品の開発段階で考慮することが必要な技術的要件に関するICH国際調和ガイドラインが作成され、国内ガイドラインとして公表されている。これらは企業による新薬開発を対象としたものであるが、生体内タンパク質の医薬品への応用をめざしたトランスジェニックリサーチの実施の条件を考える上での参考となる。以下がこれらのガイドラインである: (1)「遺伝子発現構成体ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第3号 平成10年1月6日)」: 主として遺伝子組換え技術を用いて医薬品製造用細胞を作製する場合の遺伝子発現構成体の設計、作製、細胞への導入、導入後の安定性チェックに関する注意点; (2)「細胞基材ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第873号 平成12年7月14日)」: バイオ医薬品の製造に使用する細胞基材の由来、調整、特性

解析、管理に関する注意点; (3)「安定性ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第6号 平成10年1月6日)」: タンパク質性医薬品の安定性試験に関する注意点; (4)「ウイルス安全性ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第329号 平成12年2月22日)」: 製品のウイルス汚染に関する配慮、試験に関する注意点; (5)「タンパク質性医薬品の特性解析・品質規格ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第571号 平成13年5月1日)」: 医薬品の特性解析および品質規格設定にあたっての注意点; (6)「同等性・同質性ガイドライン (厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知 薬食審発第0426001号 平成17年4月26日)」: 製造工程の変更にとまなう医薬品の同等性/同質性評価にあたっての注意点; (7)「非臨床安全性評価ガイドライン (厚生省医薬安全局審査管理課長通知 医薬審第326号 平成12年2月22日)」: 臨床試験に先立つ非臨床安全性試験に関する注意点。

これらタンパク質性医薬品を低分子化学合成医薬品と比較すると、(1)タンパク質の高次構造解析に限界があるため、構造の完全な同定、確認がしばしば困難であり、生物活性に基づく評価が重要; (2)製造の一定性を確保することが困難な細胞を利用して製造し、また翻訳後修飾等により分子多様性がある物質が多いので、物質の一定性の確保が重要; (3)常温で不安定な物質が多く、実時間で安定性の確認および保存条件の確保が重要; (4)製造に生体由来原料を使用するので、感染症に対する配慮が重要; (5)品質確保のために遺伝子発現構成体、細胞基材、宿主由来不純物など製造工程管理が重要; (6)物質としては天然のタンパク質に近いので、薬理作用および作用メカニズムの予測は容易であるが、種差により動物を用いた非臨床試験が不適切な場合もある; (7)体内動態試験は方法論に限界がある場合がある; (8)ヒトタンパク質の場合、種差、抗原性等により、げっ歯類動物を用いた非臨床安全性試験の予測性に限界がある、といった特徴がある。とりわけバイオロジクスの場合は被験物質の一定性の確保は、いかなるTRにおいてもデータの信頼性をはかる上で極めて重要であり、大学等での研究では見逃されがちな点である。(次号に続く)

(国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部)
川西 徹 Toru Kawanishi
e-mail: kawanish@nihs.go.jp

キーワード: トランスレーショナルリサーチ,
バイオロジクス, 創薬

バイオリジクスのトランスレーショナルリサーチ (TR) (その2)

前号でタンパク質性医薬品のTR実施の参考となると思われる医薬品開発関連のガイドラインを紹介したが、その他のガイドラインとして、「医薬品の臨床試験のための非臨床安全性試験の実施時期について(厚生省医薬安全局審査管理課長通知 別添 医薬審第1019号 平成10年11月13日発, 医薬審第1831号 平成12年12月27日改正)」があげられる。これは主として化学合成医薬品を対象として、臨床試験実施までに非臨床安全性試験で確認しておくべき事項をまとめたものであり、タンパク質性医薬品のTR実施の条件を考える上で参考となろう。また臨床試験の実施要領に関しては、「医薬品の臨床試験の実施の基準(GCP)(厚生省令第28号 平成9年3月27日付)」があり、(1)インフォームドコンセントの徹底、(2)治験審査委員会(IRB)における臨床試験実施計画や患者説明文書の審議の必須化、(3)研究資金提供先と研究者との関係の十分な開示、(4)臨床試験で発生する有害事象・副作用に関する情報の国あるいはIRBなどへの報告の義務化、(5)第三者機関などへの臨床試験の進捗状況のモニタリング・監査の義務化、など臨床試験が備えるべき条件がまとめられている。なおGCPは、さらに医師主導型治験を可能にするための改正がなされている(厚生労働省令第106号 平成15年6月12日付)。

タンパク質性医薬品以外に、近年ヒト由来細胞あるいは組織を疾病治療に用いる細胞治療が活発に試みられるようになってきている。この細胞治療に関するガイドラインとしては、細胞治療用医薬品の開発を目指して臨床研究や治験を行うにあたっての科学のおよび倫理的妥当性を示す上での基本的考え方、必要とされるデータや留意事項を扱った、「細胞・組織利用医薬品等の取扱い及び使用に関する基本的考え方(厚生労働省医薬安全局長通知 医薬発第266号 昭和13年3月28日発)」があり、製品の品質、安全性確保に関する技術的要件の他、細胞・組織採取段階における医療機関の倫理委員会での審査、ドナーに対する説明・同意、ドナーの選択基準や適格性に関する事項、また使用段階における患者に対する説明と適用についての同意、患者などに関する情報の把握、個人情報の保護に関する事項などが上げられている。また我が国ではヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品又は医療用具に係る治験を依頼しようとする場合、厚生労働大臣にその安全性及び品質の確認を求める必要がある(確認申

請)。その際の提出資料の内容については「ヒト由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針(厚生労働省医薬安全局長通知 医薬発第1314号 平成12年12月26日発)」にまとめられている。

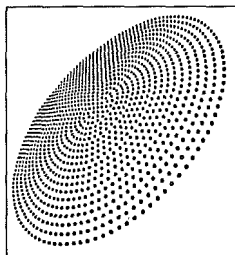
細胞治療とならんで先端的医療の代表ともいえる遺伝子治療では、治療行為として行う場合(遺伝子臨床研究)と、製薬企業等が遺伝子治療用医薬品を開発する場合(遺伝子治療用医薬品の治験)とで参照すべきガイドラインが異なる。前者では「遺伝子治療臨床研究に関する指針(13文科振第1144号科発第0327001号 平成14年3月27日)」があり、適用対象疾患の規定、治療に用いるベクター等の品質等の確認、インフォームドコンセントの明確化、実施機関の責任者の業務、審査委員会、厚生労働大臣へ意見を求める確認申請、記録の保存、秘密保護等などについて述べられている。この指針は一部改正され(16文科振第931号科発第1228003号 平成16年12月28日)、研究実施主体の責任、個人情報の取り扱いを含めた倫理面で手続き等がさらに明確化された。また後者の遺伝子治療薬の治験では「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について(通知)(厚生省薬務局通知 薬発第1062号 平成7年11月15日)」、および「遺伝子治療臨床研究に関する指針(厚生省告示第23号 平成6年2月8日厚生大臣)」があり、さらにその改正版(厚生労働省通知医薬発第0329004号 平成14年3月29日)が出されている。以上の細胞治療や遺伝子治療に関するガイドラインは、バイオリジクスのTR実施の際の、特に倫理面での考え方の参考になると思われる。

なお、バイオリジクスは生体由来材料を製造に用いることから、特に感染症への配慮が求められる。「生体由来原料基準(厚生労働省告示210号 平成15年5月20日)」には医薬品製造に用いる生物由来原料に関する基準が定められているが、TR実施においても、検討対象とする物質の製造に用いる原料に関して参考になろう。

以上、2回にわたってバイオリジクスのTR実施に際し、参考となる我が国の医薬品開発関連ガイドラインを紹介した。以上のガイドラインについては、そのほとんどは国立医薬品食品衛生研究所のホームページ(<http://www.nihs.go.jp/index-j.html>)の厚生労働省関連情報より検索/ダウンロードが可能である。

(国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 川西 徹 Toru Kawanishi)

キーワード: トランスレーショナルリサーチ, バイオリジクス, 創薬 e-mail: kawanish@nihs.go.jp



LC/MSを用いた グライコーム解析

川崎ナナ*** 橋井則貴***

伊藤さつき* 原園 景* 川西 徹*

Key words : LC/MS、グライコーム、グライコミクス、糖タンパク質、糖ペプチド、糖鎖

はじめに

細胞・組織に発現している全タンパク質(プロテオーム)を系統的・網羅的に解析することによって生命現象を解き明かそうとするプロテオミクスに高い関心が集まっている¹⁾。さらに最近では、細胞内タンパク質の主な翻訳後修飾の一つである糖鎖が、タンパク質の機能調節等を介して様々な疾患や発生・分化等に深く関わっていることが明らかになってきたことから²⁻⁸⁾、細胞・組織発現糖タンパク質やその糖鎖部分の構造・機能を解析しようとするグライコミクスへの関心も高まっている^{9,10)}。

プロテオミクスの基盤的技術である質量分析法(MS)は、グライコミクスにおいても、糖タンパク質や糖鎖の構造特性解析のための有用なツールとして期待されている^{11,12)}。しかし、糖タンパク質は複数の糖鎖結合部位に

様々な糖鎖が結合した不均一な集合体であることや、糖鎖が結合することによってMSにおけるイオン化効率が低下するなどの問題があるため、プロテオミクスの手法をそのまま利用できない場合が多い。そこで、レクチンや各種液体クロマトグラフィー(LC)など、糖鎖生物学分野で従来から利用されてきた糖鎖構造解析技術と、MSやデータベースを中心としたプロテオミクスの技術を組み合わせた様々なグライコーム解析技術の開発が進められている^{13,14)}。中でもLCとMSをオンラインで結んだLC/MSは、イオン化を妨害する物質を除去したり、不均一な糖鎖混合物を分離しながら、直接質量分析を行うことが可能な分析技術で、簡便・迅速なグライコーム解析法として優れている。本稿では、LC/MSを利用したグライコーム解析例をいくつか紹介する。

1. LC/MSによる細胞糖鎖の解析

疾患や発生・分化等に伴う糖鎖構造や糖鎖分布の微細な変化を見つけ出すには、糖タン

*国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部

**独立行政法人科学技術振興機構(JST)戦略的創造研究推進事業(CREST)

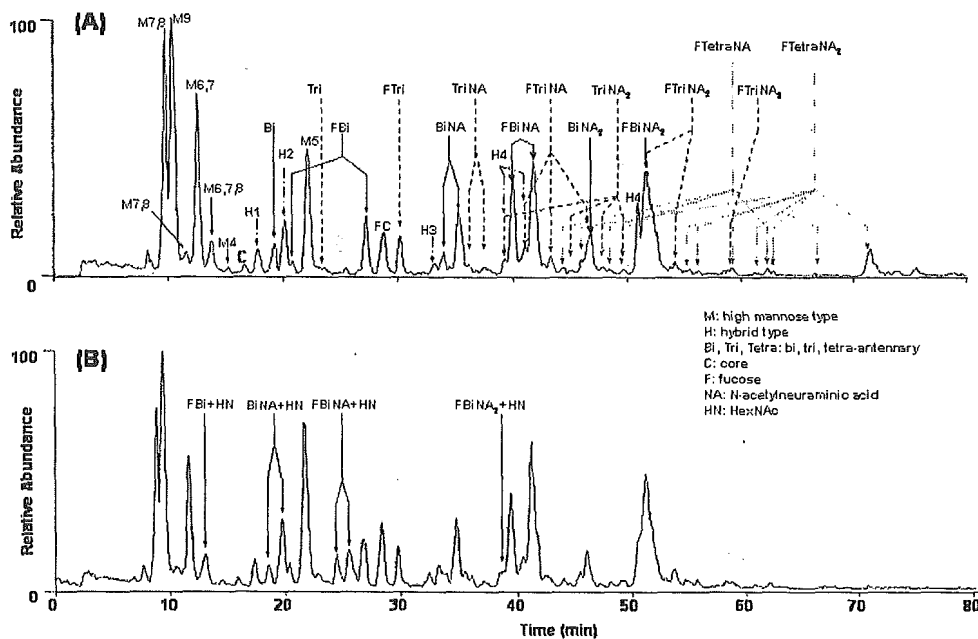


図1 (A) CHO細胞、及び(B) GnT-III遺伝子導入CHO細胞の糖鎖プロファイル

サンプル：CHO細胞(1×10^7)膜画分からN-グリコナーゼによって切り出した糖鎖を NaBH_4 で還元した
 LC/MS：カラム，グラファイトカーボンカラム (0.2 x 150 mm)；溶離液A, 5 mM 酢酸アンモニウム/2 %
 アセトニトリル；溶離液B, 5 mM 酢酸アンモニウム/80 %アセトニトリル；グラジエント, B液 10-45 %
 (90分)；流速, $2 \mu\text{l}/\text{min}$ ；MS, TSQ-7000(サーモエレクトロン)

パク質から切り出した糖鎖を LC/MS を用いて解析する糖鎖プロファイリングが適している。構造糖鎖生物学分野ではこれまでに、糖鎖誘導体化とLCを組み合わせた様々な分離技術が開発されている¹⁵⁻¹⁷。これらをオンライン MS と組み合わせることによって、糖鎖不均一性の高い試料の解析が容易になる^{18, 19}。筆者らは、糖タンパク質からN結合型糖鎖を酵素的に切り出し、還元末端を NaBH_4 で還元した後、親水性物質に対する吸着能の高いグラファイトカーボンカラムを用いて LC/MS (GCC-LC/MS) を行う糖鎖プロファイリング法を開発している²⁰⁻²³。以下に GCC-LC/MS を用いて細胞発現糖タンパク質の糖鎖を解析した例を2つ紹介する。

1.1 糖鎖プロファイリング

図1A は CHO 細胞の膜画分からN結合型糖鎖を酵素的に切り出した後、 NaBH_4 で還元し、GCC-LC/MS 操置で分析して得られた結果をトータルイオンクロマトグラム (TIC) として表したもので、糖鎖の分布 (プロファイ

ル) を示している。各ピークの糖鎖構造は、MS によって測定された質量を基に推定された単糖組成より、高マンノース型、及び2本鎖を中心とした複合型シアロ糖鎖であると推定された²⁴。図1B は、CHO細胞に N-アセチルグルコサミン転移酵素 III (GnT-III) 遺伝子を導入した CHO 細胞の糖鎖プロファイルである。GnT-III はトリマンノシルコアの β 1-4Man に GlcNAc を付加させる酵素である。GnT-III が導入された細胞には複数の新しい糖鎖が出現していることがわかる。これらは質量から、CHO 細胞に結合している 2本鎖糖鎖に N-アセチルヘキサミン (HexNAc) が1分子 (203Da) 付加した糖鎖であることが確認され、GnT-III によって生じた GlcNAc 付加糖鎖と推定された。このように糖鎖プロファイリングは、サンプル間の糖鎖の構造や分布を比較する方法として優れ、糖鎖生合成経路に起きた変化や、その変化に伴って生じた糖鎖の構造解析に利用できると期待される。

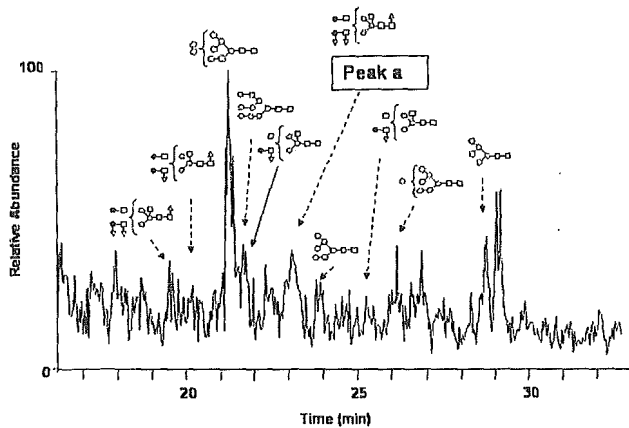


図2 マウス腎臓の糖鎖プロファイル

サンプル：腎臓(20 μ gタンパク質)の膜を含む画分からN-グリコナーゼによって切り出した糖鎖をNaBH₄で還元した

LC/MS：カラム及び溶離液、図1に準ずる；グラジエント、B液 5-45% (60分)；流速、2 μ l/min；MS, LTQ (サーモエレクトロン)

●, Gal; ○, Man; □, GalNAc; △, Fuc

1.2 糖鎖配列解析

糖鎖の配列や結合様式は、MSを繰り返す多段階MS (MSⁿ)によって、ある程度決定することができる²⁵⁻²⁷。図2は、マウス腎臓の膜画分から切り出したN結合型糖鎖を2-アミノピリジンで誘導体化し、LC/MSによる糖鎖プロファイリングを行ったものである。主な糖鎖は質量から、高マンノース型糖鎖、及び複数のフコースが結合した複合型糖鎖と推定された。各糖鎖の配列は、MSⁿにより決定した²⁸。一例として、図3にフコシル糖鎖ピークaのMS²⁻⁴スペクトルを示す。MS²によって[ヘキソース(Hex)-HexNAc-Fuc + Na]⁺ (m/z 534)、及び[Hex-HexNAc-Fuc₂ + Na]⁺ (m/z 680)が生じたことから、ピークaにはルイスb (Le^b, Fuc α 1-2Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GlcNAc)、またはその異性体ルイスy (Le^y, Fuc α 1-2Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc)構造が存在することが示唆された(図3A)。そこで、m/z 534を前駆イオンとし

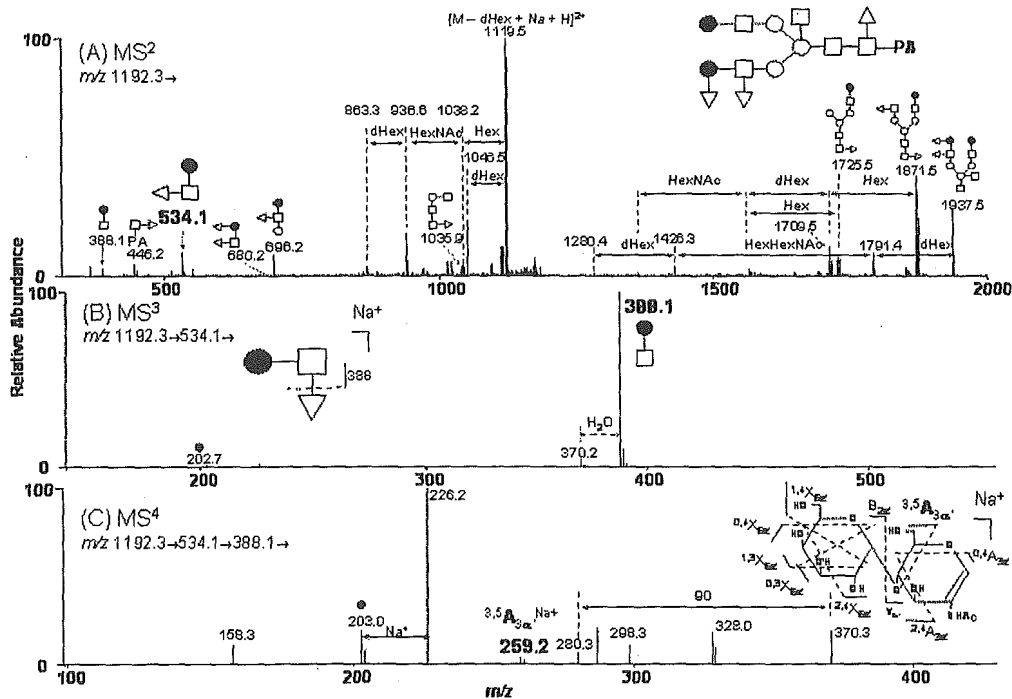


図3 図2中のピークaの (A) MS² (前駆イオン：m/z 1192.3)、(B) MS³ (前駆イオン：m/z 534)、及び (C) MS⁴ (前駆イオン：m/z 388) スペクトル

て MS³ を行ったところ、フコースが開裂した [Hex-HexNAc + Na]⁺ (*m/z* 388) が検出された (図3B)。つぎに *m/z* 388 を前駆イオンとして MS⁴ を行ったところ、環開裂した GlcNAc の 4 位炭素原子に Gal が結合したイオン (*m/z* 259) が検出されたことから、この部分構造は Le^y と決定された (図3C)。さらに、他の糖鎖のプロダクトイオンを解析した結果、マウス腎臓に結合しているフコシル糖鎖は Le^x 及び Le^y 糖鎖であることが明らかとなった。Le^x は SSEA-1 糖鎖としても知られる糖鎖エトープで、マウス ES 細胞に多く発現していることが知られ、ES 細胞の分化状態のモニタリングに利用されている糖鎖である²⁹⁾。また、シアル酸が結合したシアルル Le^x はヒト腫瘍マーカーとして利用されており³⁰⁾、マウス腎臓の主な糖鎖が Le^x 糖鎖であったことは興味深い。

2. LC/MSによる糖ペプチド解析

タンパク質から糖鎖を切り離すと、糖鎖とタンパク質間の結合に関する情報が失われてしまうので、細胞・組織中の任意の糖タンパク質糖鎖の構造特性解析は糖鎖を切り離さずに行う。膜糖タンパク質などは不溶性または高分子量タンパク質であることが多いので、還元アルキル化した後、トリプシン、Lys-C、Glu-C、または Asp-N 等で消化してから分析するのが一般的である。MS において、ペプチドに比べて糖ペプチドのイオン化効率が悪いために、ペプチドが混在すると糖ペプチドのマススペクトルが得られにくいという問題があるが、LC/MS によってペプチドを除きながら質量測定を行えば、良好な糖ペプチドのマススペクトルを得ることができる³¹⁻³³⁾。糖タンパク質消化物の LC/MS では複雑なクロマトグラムが得られることが多いが、MSⁿ やインソースフラグメンテーションによって生じた糖鎖に特徴的なイオン、例えば、HexNAc⁺ (*m/z* 204) や Hex-HexNAc⁺ (*m/z* 366) などを利用することによって、糖ペプチドの MS² スペクトルを選び出すことができる

^{32, 34)}。選び出した糖ペプチドの MS² スペクトルには、ペプチドやペプチドに GlcNAc が結合したイオンが検出されている場合が多く、これらのイオンを基にペプチドと糖鎖部分の構造を決定する^{32, 33)}。

2.1 糖タンパク質の網羅的解析

図4A は、アルブミンをある程度除去したヒト血清のトリプシン消化物 0.02 μl 相当を、C18カラムを用いた LC/MS² 装置で分析して得られた MS¹ の TIC である。血清は様々なタンパク質の混合物であるので、非常に多くのペプチドが検出されているが、MS² によって生じた HexNAc⁺ (*m/z* 204) を指標として、糖ペプチドの MS² スペクトルを選び出した (図4B)。選び出した糖ペプチドのペプチド配列と糖鎖構造は、MS² スペクトルを基に決定した。一例として図5 にピーク b の MS² スペクトルを示す。*m/z* 1442 に検出されている [ペプチド + GlcNAc + 2H]²⁺、及びペプチド由来のフラグメント (b, yイオン) から、この糖ペプチドはハ

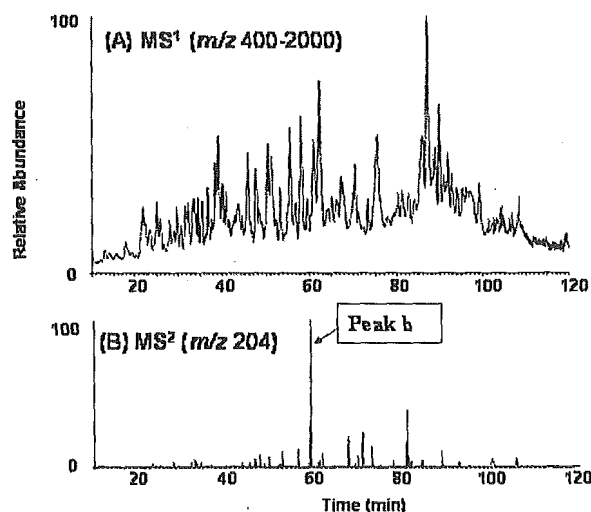


図4 (A) アルブミン除去ヒト血清トリプシン消化物の LC/MS によって得られた TIC、(B) LC/MS/MS によって生じた *m/z* 204 イオンのマスプロットグラム
LC/MS: カラム, C18 (0.2 x 50 mm); 溶離液 A, 0.1 % ギ酸-2 % アセトニトリル; 溶離液 B, 0.1 % ギ酸-90 % アセトニトリル; グラジエント, B 液 5-50% (120 分); 流速, 2 μl/min; MS, QSTAR (アプライドバイオシステムズ)

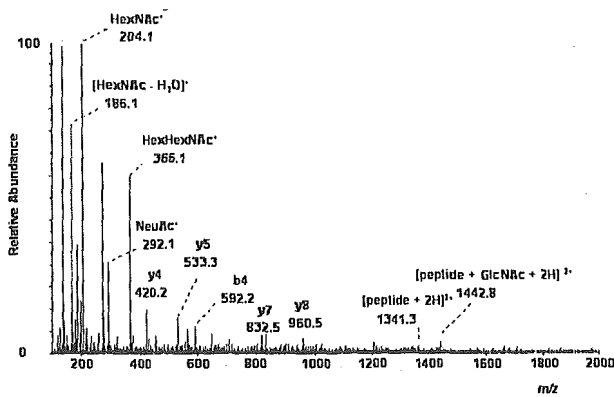


図5 図4B中のピークbのMS²スペクトル

プトグロビンの Met120-Lys143 と推定された。また、糖鎖構造は、糖ペプチドの分子量とペプチド部分の分子量の差からジシアロ2本鎖糖鎖と推定された。この方法により、ハプトグロビンの他、血清中のトランスフェリン由来糖ペプチドなども解析することができた。

2.2 糖鎖構造選択的糖タンパク質解析

ペプチド混合物の中からすべての糖ペプチドを選び出す場合は、糖鎖にほぼ共通して存在するHexNAc⁺を利用するが、任意の糖鎖を有する糖ペプチドのみを選び出す場合は、その構造に特徴的なイオンを利用する。例えば、マウス腎臓から前述したLe^x結合ペプチドを見つけただす場合は、Le^xに相当するHex-(Fuc)HexNAc⁺ (m/z 512) 及びHex-HexNAc⁺ (m/z 366)を指標とすればよい。図6は、マウス腎臓膜画分をトリプシン消化し、フコースを認識するAALレクチンアフィニティークロマトグラフィーによりフコシル糖ペプチドを回収した後、C18カラムを用いてLC/MS^{2,3}を行った結果である。MS¹では複雑なクロマトグラムが得られたが(図6A)、MS²によってGal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc⁺を生じ(図6B)、さらにMS³によってGal β 1-4GlcNAc⁺を生じたペプチドをLe^x結合糖ペプチドとして選別した(図6C)。選び出した糖ペプチドの糖鎖構造は、別途、強度の高いイオンを前駆イオンとして自動的にMSⁿを行うデータ依存的MSⁿ

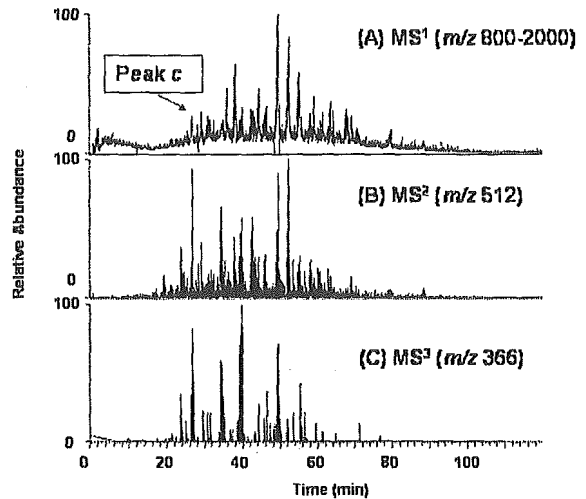


図6 (A)マウス腎臓トリプシン消化物由来フコシル糖ペプチドのTIC、(B)データ依存的MS²によって生じた m/z 512イオンのマスクロマトグラム、(C)MS³(前駆イオン： m/z 512)によって生じた m/z 366イオンのマスクロマトグラム

サンプル：マウス腎臓膜画分トリプシン消化物のAALアフィニティークロマトグラフィー吸着画分LC/MS：カラム及び溶離液、図4に準ずる；MS、LTQ

によって解析した。図7はピークcに溶出されたLe^x結合糖ペプチドのデータ依存的MS²及びMS³スペクトルである。フラグメントパターンからこの糖ペプチドは、図7に示すようなLe^x部分構造を2分子有する糖鎖であることが明らかになった。さらに、MS²で生じた[peptide + GlcNAc + 2H]²⁺ (m/z 906)を前駆イオンとしてMS³を行った後、プロテオミクスで利用されているデータベース検索を行ったところ、この糖ペプチドはガンマグルタミルトランスフェラーゼのLHNQLLPN*TTTVEK(*糖鎖結合位置)と推定された。マウスガンマグルタミルトランスフェラーゼにLe^x糖鎖が結合していることは、木幡らによって報告されている³⁵⁾。このように、これまでは糖タンパク質を特定してから糖鎖を解析するのが一般的であったが、LC/MSⁿとタンパク質データベース検索を利用することによって、任意の糖鎖構造からタンパク質を特定することが可能となってきた。

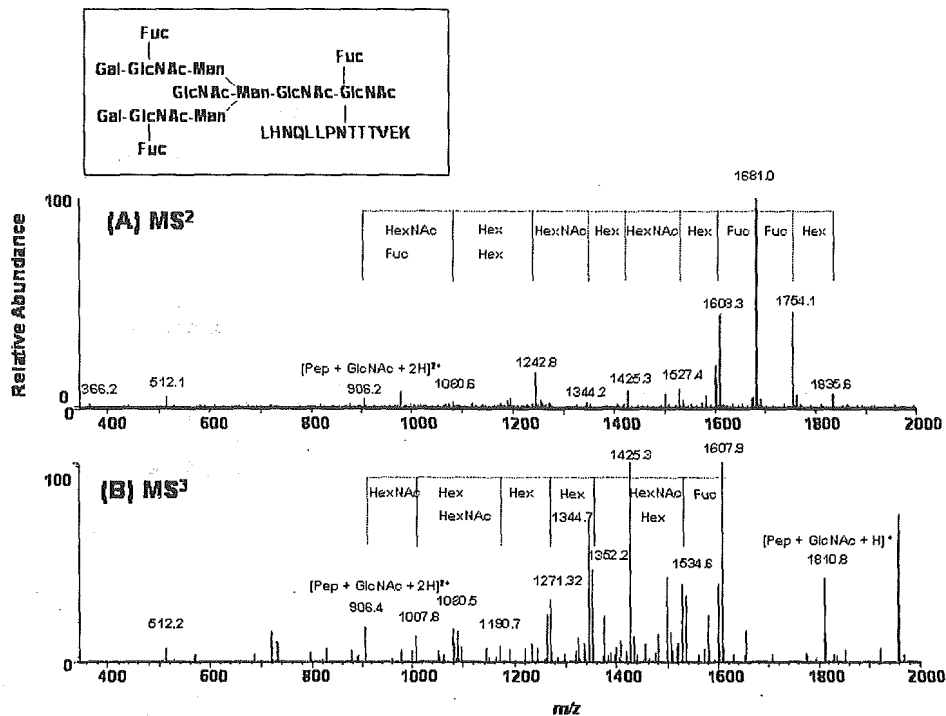


図7 図6中のピークcの位置に溶出された糖ペプチドの (A) データ依存的MS²、及び (B) データ依存的MS³スペクトル

3. 電気泳動法とLC/MSを用いた糖タンパク質の構造特性解析

細胞内糖タンパク質をインタクトのまま扱える場合は、不溶性糖タンパク質や、複雑な混合物中の糖タンパク質の分離に優れた電気泳動を利用するのが効果的である^{36, 37)}。電気泳動を利用したグリコーム解析例を2つ示す。

3.1 レクチンブロットとLC/MSによる糖タンパク質の同定

はじめに2次元電気泳動とレクチンを利用することによって、任意の糖鎖構造を持つコアタンパク質を特定した例を示す。図8Aは、前述のGnT-III遺伝子導入CHO細胞の2次元電気泳動図である。PHA-E₄レクチン染色を行い、GnT-IIIによってGlcNAcが付加されたタンパク質の位置を特定した(図8B)。別に展開した泳動ゲルからレクチンで染まった位置に相当するスポットを切り出し、ゲル内トリプシン消化、ペプチド抽出、LC/MS、及びタンパク質データベース検索を行った結果、こ

のタンパク質はインテグリン $\alpha 3$ と同定された²⁴⁾。GnT-IIIは癌細胞転移抑制に関与していることが知られている酵素で³⁸⁻⁴⁰⁾、そのターゲットタンパク質として細胞接着に関与しているインテグリンが同定されたのは興味深い⁴¹⁾。

3.2 LC/MSⁿによるゲル内糖タンパク質の構造特性解析

つぎに、LC/MSを利用してゲル内糖タンパク質の同定、及び部位特異的糖鎖解析を行った例を示す。図9Aはマウス脳の膜画分から調製したGPIアンカー型タンパク質群をSDS-PAGEで展開し、クーマシー染色したものである。20-23kDaに表れているタンパク質は、SDSによる抽出、トリプシン消化、LC/MSⁿ(図9B)、及びデータベース検索の結果、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するThy-1と同定された。図9Cはインソースフラグメンテーションによって生じたm/z 204のイオンのマスクロマトグラムで、糖ペプチドの溶出位置を示している。各糖ペプチドの糖鎖と

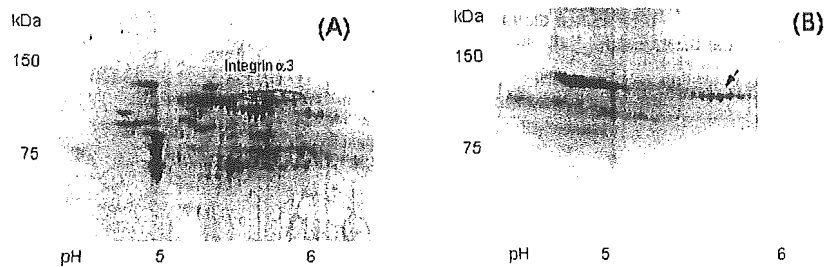


図8 GnT-III 遺伝子導入CHO 細胞の膜を含む画分の2次元電気泳動図
(A)CYPRO Orange 染色、(B)PHA-E₄レクチン染色

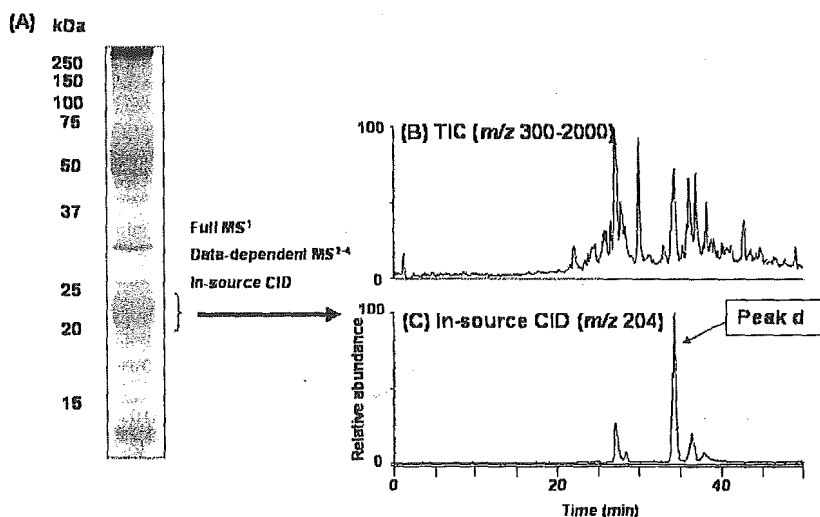


図9 (A) マウス脳由来GPIアンカー型タンパク質のSDS-PAGE、(B) 20-23kDaタンパク質トリプシン消化物のLC/MS、及び(C) インソースフラグメンテーションによって生じた m/z 204イオンのマスクロマトグラム

サンプル：20-23kDaに泳動されたタンパク質を1% SDSで抽出しトリプシン消化した
LC/MS：図6に準ずる

ペプチドは MS² 及び MS³ により決定した。一例として図10 に、図9C のピークd のデータ依存的 MS² 及び MS³ スペクトルを示す。フラグメントパターンからそれぞれ糖鎖配列、及びペプチド配列を図のように推定することができた。同様にすべての糖ペプチドの MS^{2,3}

スペクトルを解析することによって、Thy-1 の Asn23, 74, 及び 94 に結合しているN結合型糖鎖の構造を明らかにすることができた³³⁾。現在では、クーマシー染色される程度の糖タンパク質から、かなりの糖鎖構造情報を得ることが可能となってきた。

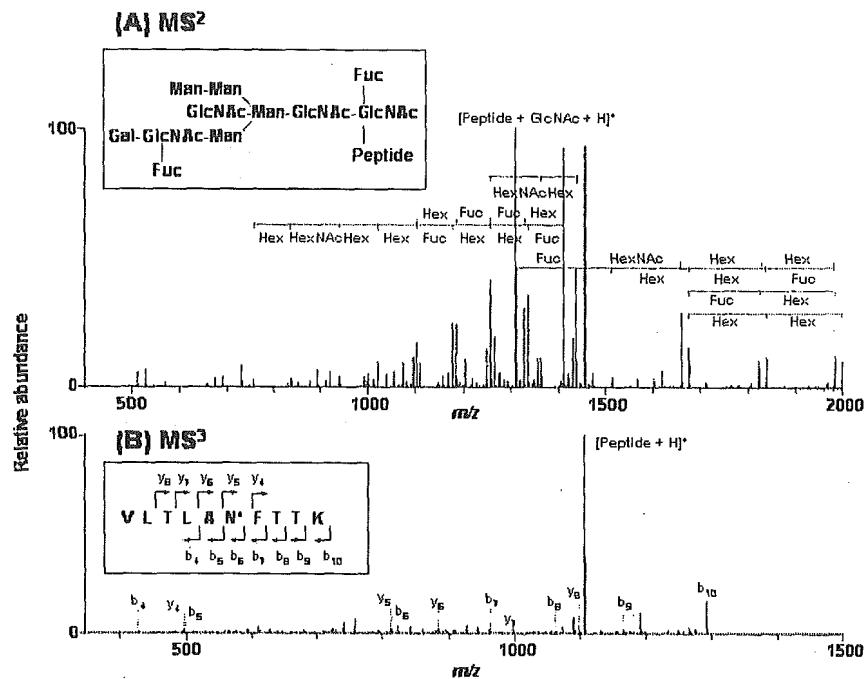


図10 図9中のピークdの(A)データ依存的MS²スペクトル、及び(B)データ依存的MS³スペクトル

おわりに

LC/MS とデータベース検索を基盤技術とするプロテオミクス的手法を糖鎖生物学分野に導入することによって、これまで「解析困難」と考えられていた細胞内糖タンパク質の構造特性が、誰にでも簡単に明らかにできるようになってきた。今後、これらのグライコム解析技術が、診断や治療法の開発を目的とした疾患関連糖鎖・糖タンパク質の研究に貢献できるようになるものと期待される。

謝辞

本稿で紹介した内容は、創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業、日本学術振興会科学研究費補助金、厚生労働科学研究費補助金、並びに CREST の支援を受けて実施した研究成果をまとめたものである。

文献

- 1) Hermjakob H, Montecchi-Palazzi L, Bader G, Wojcik J, Salwinski L, Ceol A, Moore S, Orchard S, Sarkans U, von Mering C, Roechert B, Poux S, Jung E, Mersch H, Kersey P, Lappe M, Li Y, Zeng R, Rana D, Nikolski M, Husi H, Brun C, Shanker K, Grant SG, Sander C, Bork P, Zhu W, Pandey A, Brazma A, Jacq B, Vidal M, Sherman D, Legrain P, Cesareni G, Xenarios I, Eisenberg D, Steipe B, Hogue C, Apweiler R: The HUPO PSI's molecular interaction format—a community standard for the representation of protein interaction data, *Nat Biotechnol*, **22**: 177-183, 2004.
- 2) Schachter H: Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins, *Cell Mol Life Sci*, **58**: 1085-1104, 2001.
- 3) Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP, Larsen RD, Berhend TL, Marks RM: ELAM-1--dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA, *Cell*, **63**: 475-484, 1990.
- 4) Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FC, Perez M, Singhal AK, Hakomori S, Paulson JC: ELAM-1

- mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex, *Science*, **250**: 1130-1132, 1990.
- 5) Dennis JW, Granovsky M, Warren CE: Glycoprotein glycosylation and cancer progression, *Biochim Biophys Acta*, **1473**: 21-34, 1999.
 - 6) Delves PJ: The role of glycosylation in autoimmune disease, *Autoimmunity*, **27**: 239-253, 1998.
 - 7) Gleeson PA: Glycoconjugates in autoimmunity, *Biochim Biophys Acta*, **1197**: 237-255, 1994.
 - 8) Chui D, Sellakumar G, Green R, Sutton-Smith M, McQuistan T, Marek K, Morris H, Dell A, Marth J: Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**: 1142-1147, 2001.
 - 9) 三善英知, 谷口直之: プロテオミクスから機能グライコミクスへ: 糖鎖の機能解明の重要性、*生化学*, **76**: 1337-1343, 2004.
 - 10) Taniguchi N, Ekuni A, Ko JH, Miyoshi E, Ikeda Y, Ihara Y, Nishikawa A, Honke K, Takahashi M: A glycomic approach to the identification and characterization of glycoprotein function in cells transfected with glycosyltransferase genes, *Proteomics*, **1**: 239-247, 2001.
 - 11) Morelle W, Michalski JC: Glycomics and mass spectrometry, *Curr Pharm Des*, **11**: 2615-2645, 2005.
 - 12) Dell A, Morris HR: Glycoprotein structure determination by mass spectrometry, *Science*, **291**: 2351-2356, 2001.
 - 13) Kaji H, Saito H, Yamauchi Y, Shinkawa T, Taoka M, Hirabayashi J, Kasai K, Takahashi N, Isobe T: Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins, *Nat Biotechnol*, **21**: 667-672, 2003.
 - 14) Qiu R, Regnier FE: Use of multidimensional lectin affinity chromatography in differential glycoproteomics, *Anal Chem*, **77**: 2802-2809, 2005.
 - 15) Hase S, Ikenaka T, Matsushima Y: A highly sensitive method for analyses of sugar moieties of glycoproteins by fluorescence labeling, *J Biochem (Tokyo)*, **90**: 407-414, 1981.
 - 16) Tomiya N, Awaya J, Kurono M, Endo S, Arata Y, Takahashi N: Analyses of N-linked oligosaccharides using a two-dimensional mapping technique, *Anal Biochem*, **171**: 73-90, 1988.
 - 17) Takahashi N, Nakagawa H, Fujikawa K, Kawamura Y, Tomiya N: Three-dimensional elution mapping of pyridylaminated N-linked neutral and sialyl oligosaccharides, *Anal Biochem*, **226**: 139-146, 1995.
 - 18) Suzuki-Sawada J, Umeda Y, Kondo A, Kato I: Analysis of oligosaccharides by on-line high-performance liquid chromatography and ion-spray mass spectrometry, *Anal Biochem*, **207**: 203-207, 1992.
 - 19) Lattova E, Perreault H: Profiling of N-linked oligosaccharides using phenylhydrazine derivatization and mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **1016**: 71-87, 2003.
 - 20) Kawasaki N, Ohta M, Hyuga S, Hashimoto O, Hayakawa T: Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Anal Biochem*, **269**: 297-303, 1999.
 - 21) Kawasaki N, Ohta M, Itoh S, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T: Usefulness of sugar mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessments of glycoprotein products, *Biologicals*, **30**: 113-123, 2002.
 - 22) Itoh S, Kawasaki N, Ohta M, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T: Simultaneous microanalysis of N-linked oligosaccharides in a glycoprotein using microbore graphitized carbon column liquid chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, **968**: 89-100, 2002.
 - 23) Kawasaki N, Haishima Y, Ohta M, Itoh S, Hyuga M, Hyuga S, Hayakawa T: Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin, *Glycobiology*, **11**: 1043-1049, 2001.
 - 24) Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Hyuga M, Kawanishi T, Hayakawa T: Glycomic/glycoproteomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry: Analysis of glycan structural alteration in cells *Proteomics*, In press.
 - 25) Takegawa Y, Deguchi K, Ito S, Yoshioka S, Nakagawa H, Nishimura S: Structural assignment of isomeric 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides using negative-ion MSn spectral matching, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**: 937-946, 2005.
 - 26) Takegawa Y, Deguchi K, Ito S, Yoshioka S, Sano A, Yoshinari K, Kobayashi K, Nakagawa H, Monde K, Nishimura S: Assignment and quantification of 2-aminopyridine derivatized oligosaccharide isomers coeluted on reversed-phase HPLC/MS by MSn spectral library, *Anal Chem*, **76**: 7294-7303, 2004.
 - 27) Domon B, Costello CE: Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry,

- Biochemistry, **27**: 1534-1543, 1988.
- 28) Hashii N, Kawasaki N, Itoh S, Harazono A, Matsuishi Y, Hayakawa T, Kawanishi T: Specific detection of Lewis x-carbohydrates in biological samples using liquid chromatography/multiple-stage tandem mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **19**:3315-3321, 2005.
 - 29) Brown DG, Warren VN, Pahlsson P, Kimber SJ: Carbohydrate antigen expression in murine embryonic stem cells and embryos. I. Lacto and neo-lacto determinants, *Histochem J*, **25**: 452-463, 1993.
 - 30) Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N: Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis, *Cancer Sci*, **95**: 377-384, 2004.
 - 31) Satomi Y, Shimonishi Y, Hase T, Takao T: Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**: 2983-2988, 2004.
 - 32) Harazono A, Kawasaki N, Kawanishi T, Hayakawa T: Site-specific glycosylation analysis of human apolipoprotein B100 using LC/ESI MS/MS, *Glycobiology*, **15**: 447-462, 2005.
 - 33) Itoh S, Kawasaki N, Harazono A, Hashii N, Matsuishi Y, Kawanishi T, Hayakawa T: Characterization of a gel-separated unknown glycoprotein by liquid chromatography/multistage tandem mass spectrometry: Analysis of rat brain Thy-1 separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *J.Chromatogr A*, **1194**:105-117,2005.
 - 34) Huddleston MJ, Bean MF, Carr SA: Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests, *Anal Chem*, **65**: 877-884, 1993.
 - 35) Yamashita K, Hitoi A, Tateishi N, Higashi T, Sakamoto Y, Kobata A: The structures of the carbohydrate moieties of mouse kidney gamma-glutamyltranspeptidase: occurrence of X-antigenic determinants and bisecting N-acetylglucosamine residues, *Arch Biochem Biophys*, **240**: 573-582, 1985.
 - 36) Itoh S, Harazono A, Kawasaki N, Hashii N, Matsuishi Y, Kawanishi T, Hayakawa T: Glycosylation analysis of glycoproteins by LC/MS/MS: analysis of glycosylation sites and of site-specific heterogeneity, *J Electrophoresis*, **48**: 163-168, 2004.
 - 37) Wilson NL, Schulz BL, Karlsson NG, Packer NH: Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins, *J Proteome Res*, **1**: 521-529, 2002.
 - 38) Taniguchi N, Miyoshi E, Ko JH, Ikeda Y, Ihara Y: Implication of N-acetylglucosaminyltransferases III and V in cancer: gene regulation and signaling mechanism, *Biochim Biophys Acta*, **1455**: 287-300, 1999.
 - 39) Yoshimura M, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi S, Taniguchi N: Suppression of lung metastasis of B16 mouse melanoma by N-acetylglucosaminyltransferase III gene transfection, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**: 8754-8758, 1995.
 - 40) Bhaumik M, Harris T, Sundaram S, Johnson L, Guttenplan J, Rogler C, Stanley P: Progression of hepatic neoplasms is severely retarded in mice lacking the bisecting N-acetylglucosamine on N-glycans: evidence for a glycoprotein factor that facilitates hepatic tumor progression, *Cancer Res*, **58**: 2881-2887, 1998.
 - 41) Isaji T, Gu J, Nishiuchi R, Zhao Y, Takahashi M, Miyoshi E, Honke K, Sekiguchi K, Taniguchi N: Introduction of bisecting GlcNAc into integrin alpha5beta1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration, *J Biol Chem*, **279**: 19747-19754, 2004.

LC/MS in glycomics

Nana Kawasaki^{*,**}, Noritaka Hashii^{*,**},
Satsuki Itoh^{*}, Akira Harazono^{*},
Toru Kawanishi ^{*}

^{*} *National Institute of Health Sciences*

^{**} *Core Research for Evolutional Science and
Technology (CREST) of Japan Science and
Technology Agency (JST)*

Key words

LC/MS, Glycome, Glycomics, glycoprotein, glycopeptide, oligosaccharide

抗体医薬の現状と展望

新見 伸吾*, 原島 瑞*, 川西 徹*, 早川 堯夫**

(受付:平成17年1月21日, 受理:平成17年3月9日)

State and Perspective of Antibody Therapeutics

Shingo NIIMI*, Mizuho HARASHIMA*,
Toru KAWANISHI* and Takao HAYAKAWA**

はじめに

抗体医薬の始まりは19世紀終わりのエミール・ペーリング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。更に、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¹⁾。その後、ヒト血液から精製したガンマー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²⁾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について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 (Table 1, Table 2)。そこで本稿においては抗体医薬の基礎と臨床応用、問題点等について概説する。

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定常 constant (C) 領域をヒト抗体のC領域に置き換えたものである³⁾ (Fig. 1)。更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相補性決定領域 complementarity determining region (CDR) の1から3を残して、それ以外の部分であるフレーム領域

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

Division of Biological Chemistry and Biologocals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

** 国立医薬品食品衛生研究所 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

Table 1 認可された抗体医薬

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 (株)	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		キメラ (TNF- α)	クローン病 慢性関節リウマチ	1998
Synagis® (Palibizumab)	MedImmune 社/ Abott 社		ヒト化 (RSV)	RSV 小児感染	1998
Simulect® (Basilicimab)	Novartis 社		ヒト化 (IL-2)	腎移植	1998
Herceptin® (Trastuzumab)	Genentech 社/ Roche 社	日本ロシュ (株)	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		¹³¹ I-コンジュゲート (CD20)	ノンホジキン リンホーマ	2002

(文献 122 より許可を得て転載)

Table 2 開発中の抗体医薬

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

(2003 年 1 月時点) (文献 123 より許可を得て転載)

frame region (FR) をすべてヒト抗体に置き換えたものである⁴⁾ (Fig. 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。

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、① cDNA を作製後、ブライ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、② RNA 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、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。

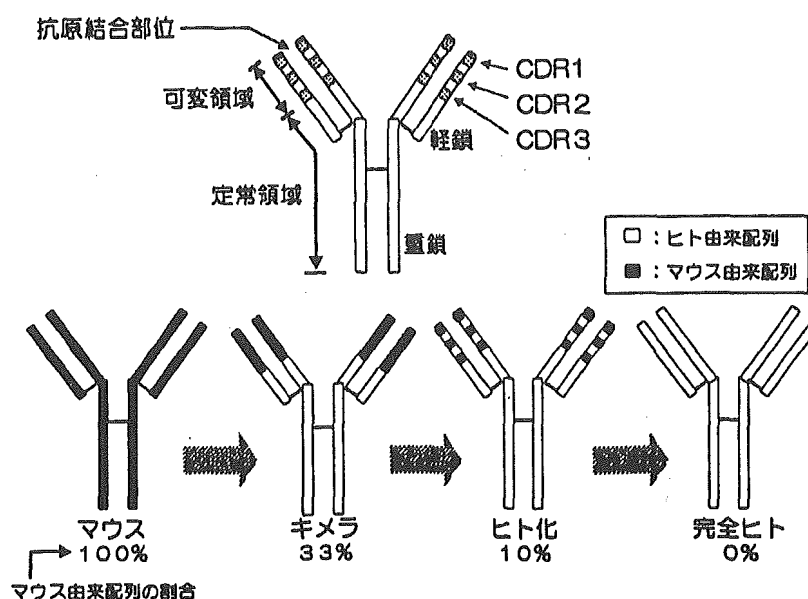


Fig.1 抗体の構造（上段）及びマウスモノクローナル抗体のヒトに対する抗原性低減技術の進展（下段）
（文献 124 より許可を得て転載）

したがって、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確認することが重要である。

キメラ抗体は、クローニングしたマウス抗体の variable (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 Ig C 領域をヒト Ig 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以下の複雑なステップからなる。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可変 (V) 領域における抗原との結合に寄与する超可変領域 (CDR) 配列とヒト抗体 V 領域におけるアイソタイプ固有のアミノ酸配列をもつフレームワーク領域 (FR) からなる 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いけ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がいくつか同定されているが⁹⁾、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⁹⁾。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。

最終的に、構築された抗体 heavy (H) 鎖及び light (L) 鎖遺伝子が挿入された発現ベクターを動物細胞に導入し、遺伝子組換え抗体を発現する。現在、上市されている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 細胞及び SP2/0 細胞である⁷⁾。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 鎖及び 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、後述する複数のエフェクター活性に必須である。したがって、動物細胞で発現しないと糖鎖が付加されないため、抗体のエフェクター活性が損なわれてしまうからで

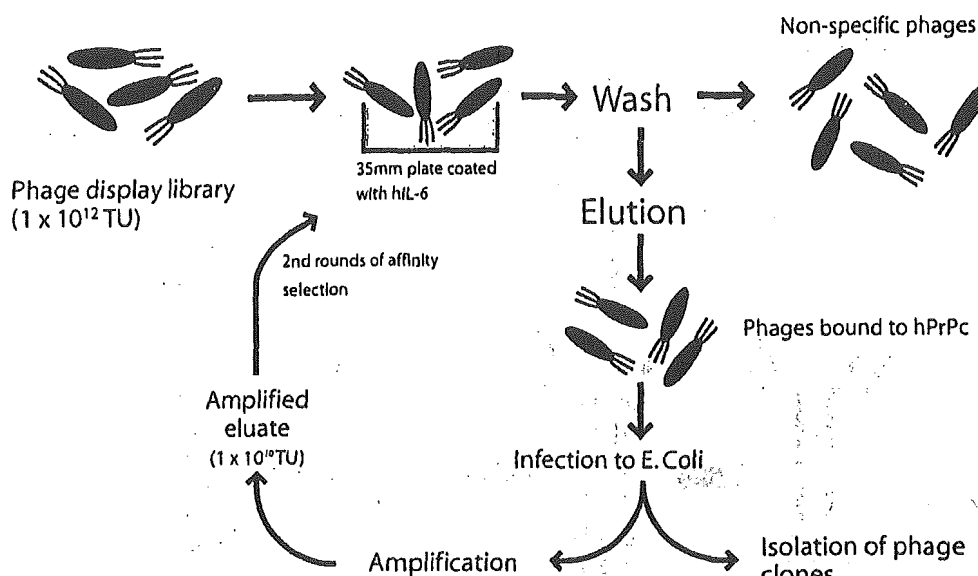


Fig. 2 ファージディスプレイライブラリーを用いたパニング方法
(文献 125 より許可を得て転載)

ある。

1.2 ファージディスプレイ抗体

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⁹⁾。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 Fv single-chain Fv (scFv) を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^{10,11)}。そしてファージライブラリーからパ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¹¹⁾ (Fig. 2)。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 (Fig. 3)。

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、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、比較的小き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。更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、ヒト血液凝固第 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¹²⁾。

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て作製するため、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

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	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> IgM mRNA 由来 再構成された V 遺伝子 </div> / <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-left: 20px;"> IgG mRNA 由来 再構成された V 遺伝子 </div>		
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

Fig. 3 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成法による分類 (文献 126 より許可を得て転載)

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 遺伝子の増幅に用いているものが特にナイーブライブラリーと呼ばれる¹³⁾。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¹⁴⁾ (Fig. 4)。

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 C 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 並びに 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 並びに 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 (Fig. 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 CDR 3 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^{15,16)}。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ンスジェニック動物の利用である。内因性 Ig をノックアウト (KO)

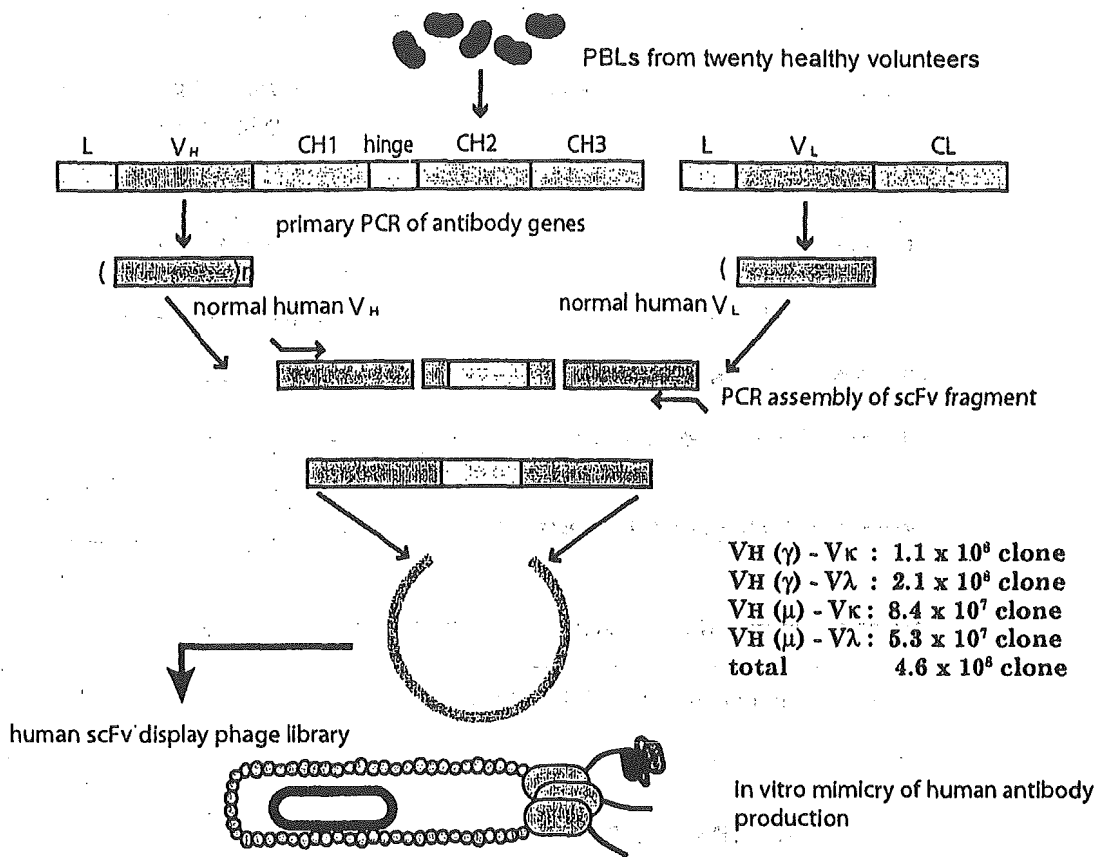


Fig. 4 ナイーブヒト抗体ファージライブラリー構築の概略
(文献125より許可を得て転載)

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考えられる。更に、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H鎖，L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^{17,18)} (Fig. 5)。抗原を接種

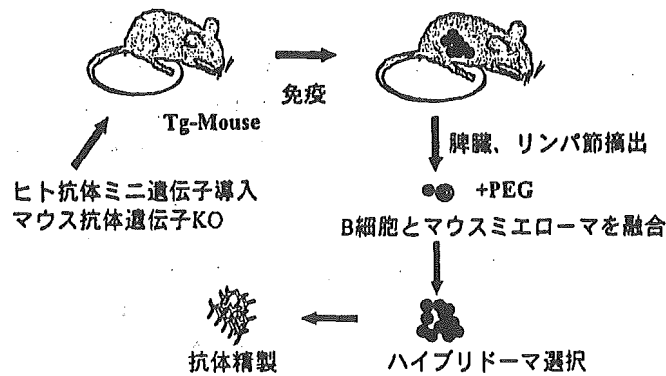


Fig. 5 トランスジェニックヒト抗体技術
(文献127より許可を得て転載)

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 (Fig. 6)。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 (H 鎖 1.5 Mb, L 鎖 \times 2 Mb, L 鎖 λ 1 Mb) を入れることはできない。また、ヒト抗体の一部 (IgG の C 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、H 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 (Fig. 7)。L 鎖 \times (2 番染色体, 約 2 Mb), L 鎖 λ (22 番染色体, 約 1 Mb) 遺伝子についても同様である。したがって、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及び軽鎖 \times 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¹⁹⁾ (Fig. 8)。ま

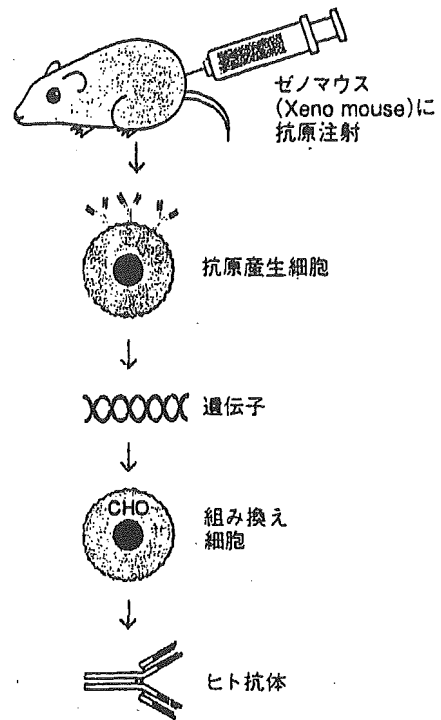


Fig. 6 アブジェニックス社のヒト抗体作製技術 (文献 123 より許可を得て転載)

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 H 鎖: 14 番染色体由来と L 鎖 \times : 2 番染色体由来を選択する。選択細胞を 48 時間程度コス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。マイクロセルにサイトカラシン B を加えて遠心分離して脱核させ、染色体が 1 つ 1 つ

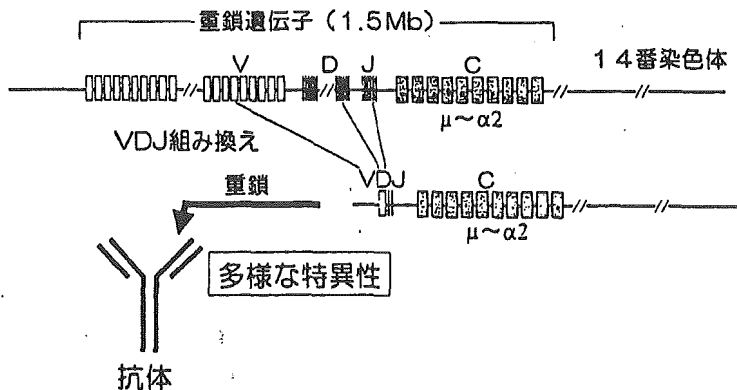


Fig. 7 ヒト抗体重鎖遺伝子の構造と VDJ 組換えによる多様性生成 (文献 124 より許可を得て転載)