

免疫工学による免疫システム分子機構の解析

Analysis of molecular mechanisms in the immune system by immunoengineering

Ⅲ. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製

— Production of antibodies by efficient utilization of protein and cell engineering —

日本医科大学 医学部 医学科 微生物学・免疫学 熊谷 善博

Yoshihiro Kumagai

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School and Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

1. はじめに

このシリーズで紹介する免疫工学とは、免疫系の機能分子、担当細胞、個体を遺伝子工学、細胞工学、タンパク質工学、発生工学などの、いわゆる、生命に手を加える手法で免疫機構の解明を試みたり、疾病の治療アイデアを提供する学問を指しているが、下記の4回のシリーズのうち、第3回目として、Ⅲ. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製について紹介する。

- I. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いたアレルギー発症機構の解析¹⁾
- II. T細胞抗原レセプター遺伝子トランスジェニックマウスを用いた免疫調節機構の解析
- Ⅲ. タンパク質工学と細胞工学を有効に利用した抗体の作製
- IV. エピトープ移植抗体 —タンパク質工学によるワクチンの創製—

KolerとMilstein¹⁾によって、初めて単一の形質細胞クローンに由来するヒツジ赤血球に対するモノクローナル抗体が細胞融合法で作製されて以来、40年近くの歳月が流れた。現在、様々なモノクローナル抗体が医学生物学の研究のみならず、治療用生物製剤としても多用され始めた。モノクローナル抗体の作製技術は、ほぼ確立されており、細胞融合と融合細胞の選択を基幹的な技術とするが、遺伝子工学、細胞工学、ならびに発生工学の技術を組み合わせて有機的に利用することにより、多様なモノクローナル抗体や関連融合タンパク質が

作製されている。このシリーズⅢでは、バイオテクノロジーを有効に利用して、単なるモノクローナル抗体の作製を超えた次世代技術ともいえる研究手法や作製手法を、筆者の研究例を中心に紹介する。

2. 遺伝子クローニングや遺伝子デザインによるモノクローナル抗体の作製: 抗体の遺伝子配列情報を用いたモノクローナル抗体の作製

細胞融合により作り出されたハイブリドーマ (Hybridoma) 全てが、安定に大量のモノクローナル抗体を分泌してくれるわけではない。特定のハイブリドーマを選択株化した後も、ハイブリドーマは必ずしも安定ではない。筆者らは、マウス/マウスの同種間ハイブリドーマの一部、マウス/ラットのハイブリドーマ、マウス/アルメニアンハムスターのハイブリドーマ、ヒト/マウスのハイブリドーマ等のような異種間ハイブリドーマにおいて、脱分化や染色体消失等を主因とした、高頻度の低産生株化や無産生株化を経験している。このようなハイブリドーマによるモノクローナル抗体産生の欠点を克服する方法の1つがトランスフェクトーマによる抗体産生法である。

トランスフェクトーマの作製方法のついてはさまざまな方法が報告されてきた。細胞融合で作出したハイブリドーマ、低抗体産生株化したハイブリドーマ、あるいは、Epstein-Varr virusで株化した抗体産生ヒト形質細胞株などから抽出したDNAから、ゲノム遺伝子ライブラリーをファージやコスミドベクターで作製し、発現型の抗体ゲノム遺伝子を取得したのち、遺伝子導入に用いる古典的な方法は、煩雑で時間や高度な技術を要するため最

近では用いられなくなった。現在は、簡便な方法として遺伝子増幅法 (Polymerase Chain Reaction:PCR)を用いる方法が主流となっている。ただし、抗体遺伝子は複数かつ多様な遺伝子断片が遺伝子再構成のプロセスを経て発現されるため、PCRに利用するプライマーのデザインが肝要となる。

3. 作製方法の流れ

図1に、筆者が遂行してきた作製法のプロトコールを、図2、3に筆者の抗体遺伝子発現コンストラクトの一例^{2),3)}を示した。表1、2、3には、抗体遺伝子増幅に利用する5'プライマーと3'プライマーについての、膨大な

情報の中から、様々な抗体可変部遺伝子や定常部遺伝子に共用でき、なおかつ、抗体の遺伝子発現の転写翻訳の条件を満たし、試験管内抗体タンパク質産生に汎用性の高いものを、例示した。実際に作製を試みる場合に参考にしてもらいたい。ハイブリドーマの樹立成功した後、抗体の特性に手を加えたり、抗体骨格を含むキメラタンパク質の創製には有用な方法である。図4に、筆者が作製した抗DNP(2,4-dinitrophenyl)基に対するIgE抗体遺伝子を、抗体H鎖とL鎖の産生を欠落したSP2形質細胞腫に導入することにより樹立したしたトランスフェクターマの産生タンパク質の還元条件下二次元電気泳動パターンを示した。効率よく抗IgE抗体H鎖(図4右写真の楕円で囲んだ上部)とL鎖(楕円で囲んだ下部)が産生されていることがわかる。

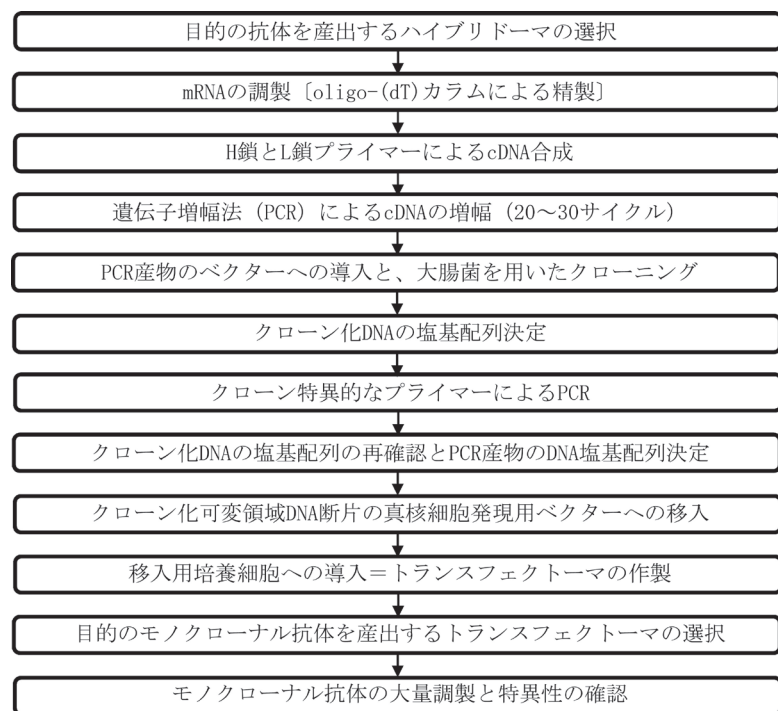


図1 遺伝子クローニングとトランスフェクターマを用いたモノクローナル抗体の作製

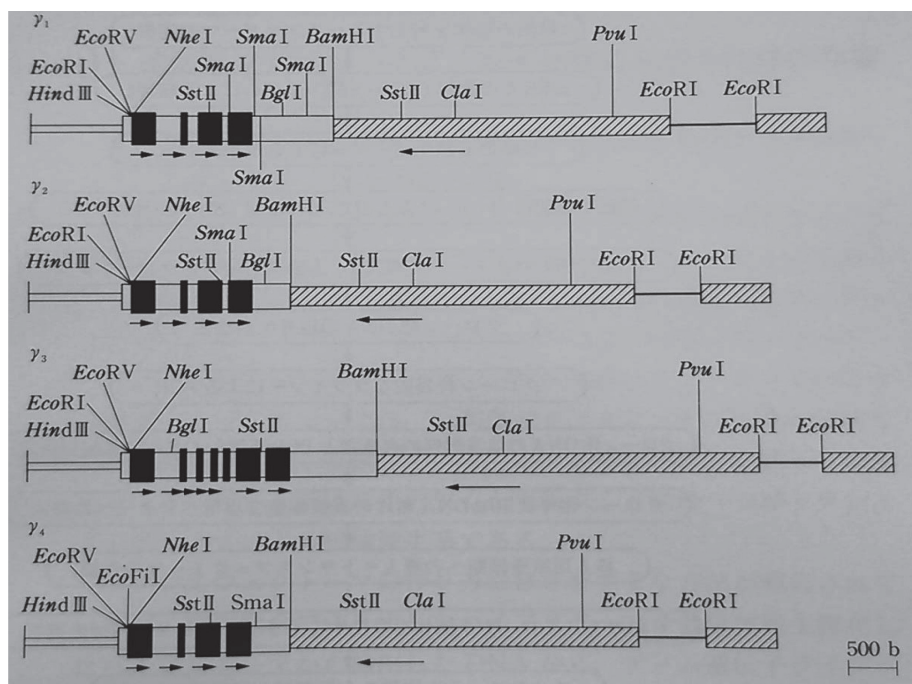


図2 ヒト抗体H鎖発現コンストラクトの例と制限酵素地図

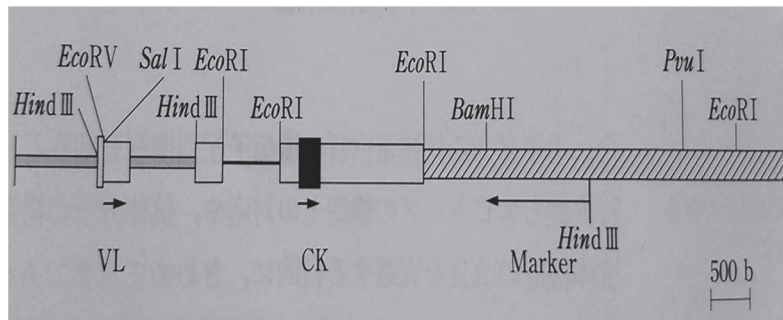


図3 マウスL鎖発現コンストラクトの例と制限酵素地図

表1 マウス抗体遺伝子のcDNA合成に利用する3'プライマーのDNA塩基配列²⁾

Immunoglobulin region	PCR primer	Primer sequence*
L chain C region	Oligo dT.R1.XBA.H3	5'-GCCGGAATTCTAGAAGC(T)17-3'
L chain C region	MCκAS.XBA**	5'-GCGTCTAGAACTGGATGGTGG-GAGATGGA-3'
H chain V region	MgC.CH1AS**3	5'-AGGTCTAGAA(C/T)CTCCACACAC-AGG(A/G)(A/G)CCAGTGGATAGAC-3'

*: Degeneracies are indicated by alternative nucleotides at a single position. XbaI cloning site is underlined.

** : Designed to hybridize to sequences coding for amino acids 122 to 116 of the murine κC region.

**3 : Antisense primer designed to hybridize to sequences coding for amino acids 130 to 120 in CH1 of all murine immunoglobulins except IgG3.

表2 遺伝子増幅用マウスH鎖可変部リーダー領域5'センスプライマー²⁾

PCR primer*	Primer sequence**
MLALT 1.RV	5'-GGGGATATCC CACCATG GAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'
MLALT 2.RV	5'-GGGGATATCC CACCATG GATTTCAGGTGCAGATTTTCAG-3'
MLALT 3.RV	5'-GGGGATATCC CACCATG (G/A)AGTCACA(G/T)AC(T/C)CAGGT-CTT(T/C)(G/A)TA-3'
MLALT 4.RV	5'-GGGGATATCC CACCATG AGG(G/T)CCCC(A/T)GCTCAG(C/T)T(C/T)CT(T/G)GG(G/A)-3'
MLALT 5.RV	5'-GGGGATATCC CACCATG AAGTTGCCTGTTAGGCTGTTG-3'

* : Five primers designed to hybridize to the amino terminus of murine L chain leader sequences. All primers are used simultaneously to amplify unknown sequences.

** : EcoRV sites (underlined) are protected by the three 5'Gs. Ribosome binding sites are indicated in bold. Degeneracies are indicated by alternative nucleotides at a single position.

表3 遺伝子増幅用マウスL鎖可変部センスプライマー²⁾

PCR primer*	Primer sequence**
MHALT 1.RV	5'-GGGGATATCC CACCATG G(A/G)ATG(C/G)AGCTG(T/G)GT(C/A)AT(C/G)CTCTT-3'
MHALT 2.RV	5'-GGGGATATCC CACCATG (A/G)ACTTCGGG(T/C)TGAGCT(T/G)GGTTTT-3'
MHALT 3.RV	5'-GGGGATATCC CACCATG GCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT-3'

* : 3'primers designed to hybridize to the amino terminus of H chain leader sequences. All primers are used simultaneously to amplify unknown sequences.

** : EcoRV sites (underlined) are protected by the three 5'Gs. Ribosome binding sites are indicated in bold. Degeneracies are indicated by alternative nucleotides at a single position.

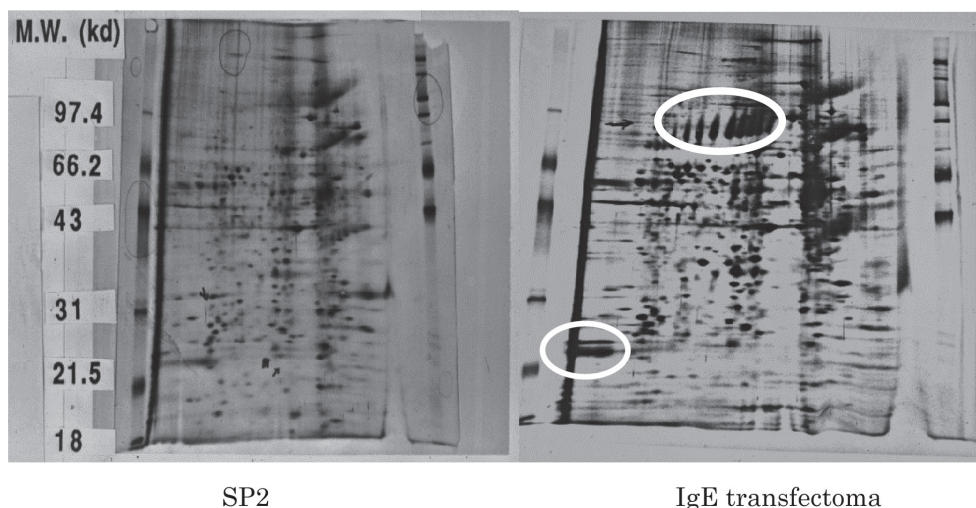


図4 IgE産生トランスフェクトマの作製

抗DNP (2,4-dinitrophenyl) 基に対するIgE抗体遺伝子を遺伝子増幅法を組み合わせ作製し、抗体H鎖とL鎖の産生を欠落したSP2形質細胞腫に導入することにより樹立したトランスフェクトマの産生タンパク質の還元条件下2次元電気泳動パターンを示した。効率よく抗IgE抗体H鎖(図4右写真の精円で囲んだ上部)とL鎖(精円で囲んだ下部)が産生されていることがわかる。左の写真は、抗体H鎖とL鎖の産生を欠落したSP2形質細胞腫のタンパク質合成パターン。検出には、高感度銀染色を用いた。

4. 二重特異性抗体産生融合細胞(クアドリオーマ)の作製

IgMは成熟分子として5量体を形成し10価のエピトープ結合価を有する。2量体IgAは4価、IgGに代表される単量体抗体では2価のエピトープ結合価を有する。抗体の多価性を利用すると、抗体の特異性が複数の

抗原に対応した抗体を作製することができる。異なった抗体可変部を単分子抗体に発現させたのが、クアドリオーマ(Quadrioma)である。

目的は多種多様にあるが、ニーズに応じて、がん細胞と毒素の両方をリンクできる抗体や抗原とELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) 用酵素の両方に反応する抗体などの報告がある⁴⁾。

クアドリオーマの選択方法には、図5に示した細胞再融合と薬剤選択を組み合わせた方法や、図6に示したフローサイトメトリー (Flowcytometry) を用いた、2種の蛍光標識後、細胞を再融合して選択する方法がある。作製された抗体の分子種によって、イオン交換クロマ

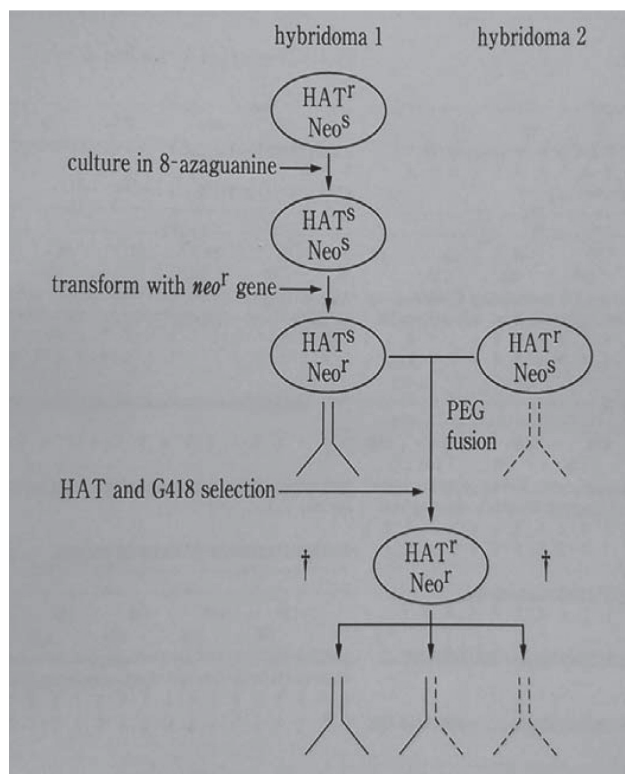


図5 2種のハイブリドーマの再融合と薬剤選択を利用したクワドリオーマの作製

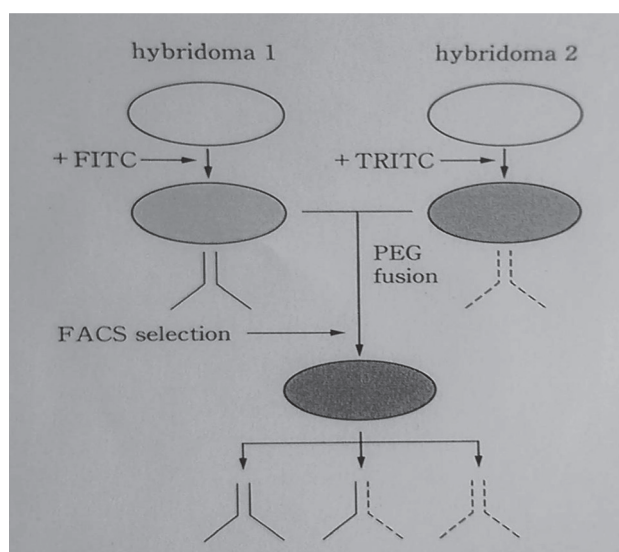


図6 フローサイトメトリーを用いたクワドリオーマの選択

トグラフィー、逆相クロマトグラフィー、あるいは、親和性クロマトグラフィーを組み合わせた高速液体クロマトグラフィーにより、二重特異性抗体を精製できる。

5. モノクローナル抗体の利用:抗体分子の遺伝子改変とモノクローナル抗体を用いた分子標的治療

近年、抗体や抗体のキメラ分子を用いた分子標的治療が臨床治療の現場で多用され始めている。分子標的治療(targeted therapy)とは、特定の分子を標的として、その分子の機能や動態を制御する治療法である。抗体やキメラ抗体を用いる場合は、標的分子への高い特異性を利用し、リガンドとその受容体の反応を阻止する活性を、主に利用している。

目的は、ガン治療や炎症反応の治療などであるが、ガン細胞排除や炎症に関わる分子を特異的に抑えることを主目的とする。従来の多くの薬剤もその作用機序を探ると何らかの標的分子を持つが、分子標的治療は創薬や治療方法の設計段階から、分子標的を定めている点で大きく異なる。

20世紀初頭に抗破傷風毒素に代表される血清療法が開始されたが、破傷風毒素を標的とした抗体の毒素中和活性を利用していることから、現在の抗体活性を利用した分子標的療法の起源は、血清療法にあるといえる。血清から免疫グロブリンのみを精製して用いたものを免疫グロブリン製剤(第1世代抗体医薬品)と呼んでいるが、標的抗原特異性を有する抗体製剤が第2世代抗体医薬品として登場した。開発初期は、マウスモノクローナル抗体を利用していたが、マウスモノクローナル抗体はヒトに対して異物であるため、大量にヒトに投与すれば、HAMA(human anti-mouse antibody)が誘導され、血清病による強いアナフィラキシーを誘導するため、ヒト型モノクローナル抗体へ改変が遂行されてきた。製剤名の末尾に-**omab**と付くものはマウスモノクローナル抗体を意味し、-**ximab**と付くものは、抗体可変部はマウス抗体であるが、定常部はヒト抗体に改変してあるキメラ抗体である。可変部も定常部もヒト型である抗体は、末尾が-**zmab**と命名されている。

昨今、分子標的治療を目的とした生物製剤の約30%はモノクローナル抗体を骨格としたキメラ抗体や遺

伝子改変抗体で、現在、20種類近くの分子標的抗体ががん治療や抗炎症治療薬として使われている。ただし、患者と社会への経済的負担が多めで、製薬会社の経済的な成功と医療上の社会的成功は全く別の問題である。それに加え、モノクローナル抗体による標的治療は、元々、このシリーズのIで紹介した免疫のパラダイム⁶⁾のバランスを大きく崩す本質を抱えており、副作用については長い時間軸を設定すればするほど未知数で、モノクローナル抗体による標的治療が、未来永劫に定着するかどうかについては懐疑を抱かざるを得ない。

6. おわりに

モノクローナル抗体作製技術の確立にノーベル賞が授与され¹⁾、臨床検査、研究、治療等さまざまな目的に汎用されている。免疫グロブリンは血中で安定性の高いタンパク質であり、標的特異性にのみならず、標的に対する持続的効果を発動することができる。これと対照的に、時を同じくした頃、試験管内実験では効果が確認できるアンチセンスDNAやアンチセンスRNAを用いた製剤は、標的細胞核への到達が不十分で、実用化への道のりは遠いと思われる。

一方、抗体関連製剤の開発は活況で、次世代モノクローナル抗体と呼ばれる、放射性同位体結合抗体や、標的特異性だけを重視し、抗体低上部が副次的に発動する補体結合反応や抗体依存性細胞障害活性等の生物活性をキャンセルした、抗体可変部位のみの単鎖抗体なども開発されつつある。

筆者も、可変部だけを持ち、標的に対し結合特異性のみを有する単鎖抗体(single chain antibody; scAb)や可溶性単鎖T細胞レセプター(single chain T Cell Receptor; scTCR)の作製に成功している(図7参照、未発表データ)。また、このシリーズの4回目として次回紹介するが、抗体の超可変部に様々なアミノ酸配列を導入し、モノクローナル抗体を抗原として作製し、ワクチンに利用するという次世代抗体(図8)も注目を集めている。



図7 可変部のみを有する単鎖抗体 (single chain antibody; scAb) や可溶性単鎖T細胞レセプター (single chain T Cell Receptor; scTCR) 抗体可変部や、T細胞レセプター α 鎖、 β 鎖可変部を遺伝子増幅法により作製し、トランスフェクトマを作製する技術と組み合わせ、中央に自由度の高いリンカー (Linker) を人為的に組み込んだ単鎖分子を作製した。左図は、精製分子の電気泳動図 (クマジーブリリアントブルー染色)、右図は、scAbとscTCRの構造模式図。

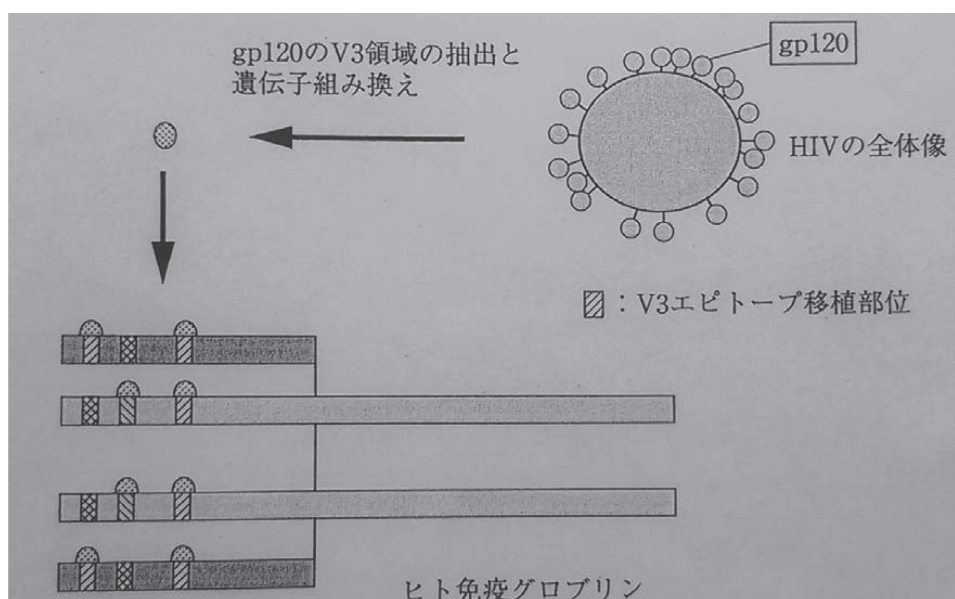


図8 エピトープ分子移植によるエイズワクチンの創製模式図⁸⁾

参考文献

- 1) Köhler, G.; Milstein, C. Nature, 1975, 256, 495-497.
- 2) 熊谷善博. 臨床消化器内科. 2001, 16(7), 815-823.
- 3) Kumagai, Y. Vaccines 94: Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS. Norrby, E., ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994, 9-14.
- 4) Kumagai, Y. Vaccines 96: Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases. Brown, F.; Norrby, E.; Burton, D.; Mekalanos, J. eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, 283-288.
- 5) Fanger, M.W. Bispecific Antibodies (Molecular Biology Intelligence Unit). R.G. Landes, Austin, Tex, 1995, 110p.
- 6) Shin, D.S.; Ribas, A. Curr. Opin. Immunol., 2015, 33, 23-35.
- 7) Callahan, M.K.; Wolchok, J.D. J. Leukoc. Biol., 2013, 94, 41-53.
- 8) Kumagai, Y. J. Nippon Med. Sch., 2011, 78(2), 66-67.