ヒト抗体の開発と応用はどこまで進んでいるか ゼノマウスの開発とその周辺

松本 隆志*

1975年のモノクローナル抗体作製法の確立以来、病気の治療に利用できるヒト抗体作製の試みが続けられてきた。その間、抗体の多様性の仕組みが解明されるなど、免疫系のメカニズムに対する理解も急速に深まってきた。一方で、発生工学と呼ばれる個体の形質の改変技術も大きな進歩をとげ、現在では任意の遺伝子をマウス個体で発現させたり、あるいはマウスの内在遺伝子を欠損させたりすることが可能になっている。こうした技術の進歩によって、これまで抗体の利用面で大きな障害となっていた免疫原性の問題、これを解決するための完全ヒト抗体作製法の問題に、今確かな答えが出されようとしている。

ほとんどの抗原は複数のエピトープをもっている。そのため、生体内ではそれぞれのエピトープと特異的に結合する様々な抗体分子が生産される。これら抗体の混合物をポリクローナル抗体と呼ぶが、これに対して、同一抗体の集団をモノクローナル抗体と呼ぶ。モノクローナル抗体を得るためには、特定の抗原エピトープで刺激を受けたB細胞を単離してコロニーを作り、分泌抗体を集めなければならない。ところが、B細胞を試験管内で

長期間培養することはきわめて難しい。一方、癌細胞は長期間培養が可能である。たとえば、HeLa細胞株は1940年代後半に樹立され、今日まで維持されている。

1975年、ジョージ・ケラーとセザール・ミルシュタインは、マウス骨髄腫細胞とB細胞を融合することにより、B細胞の不死化集団ができることを発見し、モノクローナル抗体の作製法を完成した。この融合細胞をハイブリドーマと呼ぶ。単一のハイブリドーマは増殖し、コロニーを形成することができる。しかもこれらの細胞がつくる抗体はすべて同一である⁽¹⁾。

モノクローナル抗体は、高い抗原特異性と親和性を持ち、しかも安定供給が可能なことから、病気の治療や診断に応用しようとする研究が始まった。1980年代になって、癌の診断、治療、免疫応答の調節、自己免疫疾患や臓器移植拒絶といった臨床への応用が検討された。特に抗体が癌の治療にとって強力な武器になるのではないかと大きな期待がかけられ、“魔法の弾丸 (Magic Bullets)” と呼ばれたときもあった。しかし、結果は期待に添うものではなく、予想したほど治療効果が上がらず、抗体のもつ潜在的な可能性を十分に引き出すまでにはいかなかった⁽²⁾。今日まで世界で実用化されている治療用モノクローナル抗体は、4品目にとどまっている。

* Takashi MATSUMOTO, 日本たばこ産業(株)医薬探索研究所
What is Going on for the Production and the Use of Fully Human Antibodies?

しかし、1990年代初めからの遺伝子操作、タンパク質工学、トランスジェニック動物の作製などの技術進歩は著しく、最近になってヒト抗体そのものの作製が可能になり、再び治療用抗体の新展開が期待できるようになってきた。本稿では特に、日本たばこ産業（JT）と Abgenix 社が共同開発したヒト抗体を作るトランスジェニックマウスとその周辺について解説する。

免疫原性の低減に向けて

病気の治療に抗体を利用しようとするとき、最も大きな障害はその抗体タンパク質のもつ免疫原性である。すなわち、治療用抗体そのものが、ヒトの免疫系においては抗原として認識される可能性が高い。最近までの治療用抗体は、まだ何らかの形でマウス由来のアミノ酸配列をもっていた。ヒトの免疫系は、これらマウス由来の配列を異種として容易に同定してしまう。そのため、治療用抗体に対する抗体が直ちにできる。こうしてできたヒト抗マウス抗体（human antimouse antibodies；HAMA）は、抗体の治療効果を減少させてしまう。さらに、その治療をさらに繰り返したりすると、患者は致命的なアナフィラキシーショックの危険にさらされることになる。また、血液中で抗体と HAMA の結合物が沈殿し、これが特に肝臓や腎臓に対して毒性を示すことになる。

外来タンパク質は、生体内では専門化した抗原提示細胞によって取り込まれた後、そのタンパク質はペプチドに分解され、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラス II 分子に結合する。これが細胞表面に発現してヘルパー T 細胞に提示される。これによって活性化されたヘルパー T 細胞は、B 細胞の増殖と抗体を分泌する形質細胞への分化を誘導する。抗原提示細胞は、凝集した抗原

や粒子状の抗原を好んで摂取する。抗原タンパク質が大きく複雑なほど、あるいは自己タンパク質との関連性が少ないほど、その抗原は MHC 分子に結合するペプチドを多くもち、自己のペプチドとの識別が容易になる⁽³⁾。

免疫原性に結びつくタンパク質の性質としては、①分子の大きさ、②構造、③コンフォメーション、④分解性、⑤外来性などがある。分子の大きさは、2,500 Da より小さくなると免疫原とはなりにくく、数百 kDa の大きさであれば効果的な免疫原となる。また、構造の複雑さも免疫原性に結びつく。多くの多糖類でみられるような繰り返し構造は、一般的に免疫原にはなりにくい。効果的な免疫応答は、大きな外来タンパク質分子の小ペプチド分子への分解性にも依存している。たとえば D-アミノ酸からなっている合成タンパク質のように、分解できない分子は免疫原として作用しない。

これらの視点からながめると、非ヒト抗体は最も免疫原性を高める特徴をもっているといえることができる。すなわち、抗体分子の大きさは 150~900 kDa と大きく、構造も複雑で安定なコンフォメーションをもっている。プロテアーゼで分解され、しかもヒトと異なる組成をもったタンパク質である。これらの特徴の中で、構造の複雑さ、安定なコンフォメーション、プロテアーゼによる分解などは、種が異なってもいずれの抗体タンパク質ももつ、タンパク質本来の特徴である。したがって、免疫原性を減少させるためには、分子の大きさをいかに小さくするか、外来性をいかに少なくするか、すなわち自己タンパク質との類似性をいかにして上げるかということになる。

1. 抗体の小分子化

抗原の免疫原性を減少させる方法の一つは、抗体の構

図 1 ■ 抗体の構造と抗体の小分子化

造から不必要な部分を除き、小分子化することである(図1)。抗体分子をパパイニンで部分的に消化すると、抗原と結合することのできるFabフラグメントと、抗原とは結合できないFcフラグメントを分離できる。またペプシンで切断すると、分解する場所が異なるため、一对のFabフラグメントが結合した形のF(ab')₂フラグメントが得られる。これらのフラグメントをさらに小さくし、抗体の抗原結合部位のみにすることもできる。この場合は、正しいコンフォメーションを維持できるように、V_HドメインとV_Lドメインを結合し一本鎖にする必要がある。これをsingle chain Fv (scFv)と呼ぶ。

結合には、抗体のヒンジ部分に存在するS-S結合、あるいは2つのタンパク質ドメインを安定化できる適当なリンカー分子が必要である。こうしたことで免疫原性を減少させることができる。しかし、これら小分子化したフラグメントには、抗体のFc領域に存在する補体活性化部位やマクロファージ結合部位がない。そのため、抗原抗体反応に続いて起こるエフェクター機能と呼ばれる免疫系の働きを、治療効果を上げるために利用できないことになる。一方、フラグメントが小さくなればなるほど、拡散能が増し、組織の隅々にまで浸透し、抗原に到達しやすくなり分解も速くなる。これは、血液中での速いクリアランス、標的部位への集積のしやすさにつながり、抗体によるターゲティングにとって都合のよい特徴でもある。

2. 抗体のキメラ化とヒト化

抗体の外來性を少なくし、ヒトタンパク質との類似性を増すために、多くの努力が積み重ねられてきた。たとえば治療用抗体を作るために、マウスの抗体を構成するアミノ酸配列をできるだけヒトのアミノ酸配列に近づけようとして種々の方法が考案された。

1980年代半ば、まずマウスモノクローナル抗体をハイブリドーマ法で作り、それをマウス抗体を基本にしてヒト型に近づける技術が開発された。つまり、抗原の結合に必須でないマウス抗体のパーツを、遺伝子組換えにより相当するヒトのパーツに置き換えるというものである。これをキメラ化(chimeric)とヒト化(humanized)という。

a) キメラ抗体(図2)

マウス抗体のV領域とヒト抗体のC領域を遺伝子組換えにより結合し、キメラ抗体を作製する。マウス抗体のもつ抗原特異性、親和性、結合力を損なわずに、ヒトタンパク質との類似性を増し、免疫原性を減少させようとするものである。初期の治療用抗体はこのタイプが多

図2 ■ キメラ抗体

く、ヒト抗体由来のアミノ酸配列は約70%であった。キメラ抗体の免疫原性は減少したとはいえ、まだ無視できないHAMA反応を示す⁽⁴⁾。

b) ヒト化抗体(図3)

抗体V領域は、抗体間で比較的保存されたアミノ酸配列をもつフレームワーク(FW)と、抗原の結合に直接関与し、抗原エピトープごとに異なるアミノ酸配列を示す、相補性決定部(CDR)からなっている。FWは、ジスルフィド結合で結ばれた、逆平行βシート構造をとっている。CDRは、外側に向いたループ構造をとり、抗体分子の表面を形成している。H鎖およびL鎖でそれぞれ3箇所、6個のCDRが、抗原との結合に直接関与している。

1986年遺伝子組換えにより、マウスのモノクローナル抗体から抗原との結合に必須のCDRのみを残し、FWとC領域をヒト抗体由来のアミノ酸配列とした、ヒト化抗体の作製が報告された。この技術はCDRグラフトイングとも呼ばれている。

図3 ■ ヒト化抗体

キメラ抗体では、抗原特異性、親和性に変化はなかったのに対し、この技術が開発された当初は、抗体のCDRを単純に置き換えるだけでは、十分な抗原との結合特異性や親和性を示す抗体を得ることはできなかった。そのため、CDR特有のコンフォメーションを維持するには、FW配列の一部が必要なのではないかと考えられた。そこで、FWの置換で引き起こされる、CDRのコンフォメーションのゆがみの問題を解決するために、合理的分子設計技術が駆使された。その結果、CDRの正しいコンフォメーションを維持するには、FW中の数個のアミノ酸が必要であることが明らかになった。これらは、CDRに直接隣接しているFWのアミノ酸配列であることがわかった。

CDRグラフティングでは、抗原特異性、親和性を損なわないために、マウスCDRだけではなく、こうしたマウスアミノ酸配列が保存されている。したがって、ヒト化抗体では、ヒト抗体由来のアミノ酸配列は、約90%程度にとどまる。ヒト化抗体の臨床試験が進むにつれて、ヒト化抗体の免疫原性に関する知見が蓄積されていくであろうが、現在のところ、単回投与でも抗イディオタイプ抗体の出現があると報告されている。反復投与、長期連続投与では、免疫原性が問題となる可能性は残っている⁽⁶⁾。

ヒト化キメラ抗体のマウス由来のアミノ酸配列は、ヒトの免疫系にとって、すべてが等しく免疫原性があるわけではない。免疫応答の多くは、抗体表面に存在するわずかのマウスアミノ酸配列が引き金になる。このことから、抗体表面のアミノ酸配列のみをヒト化(resurfaced)すればよいのではないかとということで、これらの配列を、構造的に似ている免疫原性のないヒトの配列に置き換え、抗体の全体構造への変化を極力抑え、抗原との結合特性にほとんど変化を与えない方法も開発されつつある。

ヒト抗体そのものの作製

異種抗体による免疫原性の問題を解決する最も簡単な答は、異種抗体ではなく、ヒト抗体そのものを用いることである。1990年代の初めから、完全ヒト抗体(fully human mAbs)の作製をめざして、2つの技術開発が別々に始まった。一つはトランスジェニックマウスによる方法であり、もう一つはファージディスプレイによる方法である⁽⁶⁾。

1980年代の初め頃、発生工学の進歩により、動物胚に外来の遺伝子を導入し、そのまま発生を続けさせ個体

の形質を変えるトランスジェニック技術が可能になった。80年代半ばには、全能性を保った胚性幹細胞(ES細胞)が樹立され、この細胞を胚盤腔内に注入することによって、ES細胞由来の子孫が得られることが示された。また、遺伝子の相同組換え(homologous recombination)の発見と効率的な濃縮法を含む応用技術の確立により、特定の遺伝子に突然変異を導入する方法、ジーンターゲティング技術が生み出された⁽⁷⁾。こうした技術の進歩のおかげで、マウスの免疫グロブリン遺伝子を、ヒトの免疫グロブリン遺伝子とそっくり入れ換えたマウスが完成した。つまり、相同組換えにより、マウスの免疫グロブリン遺伝子をターゲティングし、酵母の人工染色体(YAC)を用いて、ヒトの免疫グロブリン遺伝子をマウスゲノムに挿入したマウスである⁽⁸⁾。

このマウスの子孫は、マウス免疫グロブリンの代わりにヒト免疫グロブリンを作る。このマウスをゼノマウス(XenoMouseTM) IIと呼んでいる。ゼノマウスIIは、もとのマウスと同様に二次免疫応答を起こすことができ、治療用抗体として最も適している高い特異性と親和性をもつIgGクラスのヒト抗体を産生することができる。このゼノマウスに免疫原を投与すれば、あとはすでに一般化しているマウスモノクローナル抗体の作製手順に従って、完全ヒトモノクローナル抗体を作ることができる。正常なヒトの免疫系においては、ヒトの組織に結合するヒト抗体は産生されない。ところが、ゼノマウスの免疫系は、ヒト由来の免疫原でも外来タンパク質と認識して、ヒト抗体産生のための遺伝子転写のスイッチをオンにすることができる。

1. ゼノマウスIIの作製

完全ヒトモノクローナル抗体作製の戦略は、マウスの免疫グロブリン遺伝子座をヒトの相当する遺伝子座に置き換え、マウスの体液性免疫系を“ヒト化”することである。つまり、マウスのもつ免疫系の多様化・選択の仕組みをそのまま利用しようとするものである。

抗体分子の多様性は、いくつかの異なったメカニズムによって生み出される。その一つは、抗体の抗原結合部である可変部のH鎖、L鎖をコードする、多数の遺伝子断片の存在によって生じる。ヒトのH鎖と κ L鎖(L鎖には κ と λ があるが、ここでは κ について触れる)の遺伝子座は、14番染色体と2番染色体上に、それぞれ150万塩基対以上の大きさで存在している。H鎖遺伝子座には、 V_H 遺伝子断片として現在明らかなもの約95種類、D遺伝子断片として約30種類、 J_H 遺伝子断片として6種類、およびC領域(μ , δ , γ_3 , γ_1 , ψ ,

$\alpha_1, \psi_2, \gamma_2, \gamma_4, \varepsilon, \alpha_2$) の遺伝子断片が存在している。 κ L 鎖遺伝子座は、 V_κ 遺伝子断片として 76 種類、 J_κ 遺伝子断片として 5 種類、さらに C_κ 遺伝子断片からなっている。H 鎖遺伝子は、最初に D と J_H の間で再編成が起こり、続いて D- J_H 遺伝子ドメインと V_H 間で再編成が起こる。D の存在のためにより大きなバリエーションが可能となっている。 κ L 鎖遺伝子は、 V_κ と J_κ 間の再編成後、結合してできた V_κ - J_κ 遺伝子ドメインに C_κ が結合してできる。抗体レパートリーは、これらのごく限られた数の抗体遺伝子と、その再編成によって生じる多様性の拡大によって生み出される。

したがって、ヒトの抗体レパートリーを確立するためには、数百万塩基対にも及ぶ、ヒト免疫グロブリン遺伝子座が必要となる。これをどのようにしてクローニングし、マウスの生殖細胞系列に移行させるかは、ゼノマウス作製にとって大きな課題であった。

一方、マウスにヒトの免疫グロブリン遺伝子座をうまく導入できたとしても、マウスの免疫グロブリン遺伝子が正常に機能していれば、元のマウス遺伝子の発現が優先的に起こると考えられる。つまり、ヒト抗体産生シス

テムとして動かすためには、マウス抗体の産生を止める必要がある。そのため、マウス H 鎖の遺伝子再編成に必要な D と J_H 遺伝子領域を選び、D 領域の一部とすべての J_H 領域をターゲティングしたマウスを作った。これを、 κ L 鎖遺伝子の C_κ をターゲティングしたマウスと交配して、マウス免疫グロブリン遺伝子を不活性化したマウス、すなわちマウス抗体レパートリーをもたないマウス (double inactivated mouse ; DI マウス) を作ることができた (図 4)。この DI マウスでは、B 細胞の分化は初期の状態でとどまっており、IgM の産生はまったく行なわれていない。

初期の研究では、数個の V 遺伝子断片をもつミニ遺伝子座を、YAC または別の方法で DI マウスに導入してヒト抗体産生を調べている。この場合には、生殖細胞型のヒト遺伝子はわずか 200 kb ほどで、 V_H 遺伝子断片としては 4~5 種類、 V_κ 遺伝子断片としては 3~4 種類、さらに D, J, C 領域の遺伝子断片が入っている。このように V 遺伝子断片の数が限られたものであっても、不活性化したマウス免疫グロブリン遺伝子座に代わって組換えを起こし、完全なヒト抗体としてマウス B 細胞で発現することが確認されている^(6, 9)。このことは、近接した正常な数の D, J 遺伝子を含んでいれば、V 遺伝子の数が限られていても機能することを示している。しかし再構築された部分は小さく、できたマウスは実用的なものではなかった。成熟 B 細胞の数だけでなく、血中免疫グロブリンのレベルも低く、限られた数の抗原に対してしかヒトモノクローナル抗体は作れなかった。

マウスにおける体液性免疫の再現が不完全なのは、抗体の多様性を決定している可変部の遺伝子、すなわち V 遺伝子のレパートリーが少ないためである。そのため、ヒト免疫グロブリン遺伝子の YAC ライブラリーのスクリーニングを精力的に繰り返して、巨大な領域をカバ

図 4 ■ マウス免疫グロブリン遺伝子を不活性化したマウスの作製

図 5 ■ ゼノマウス II に導入したヒト H 鎖遺伝子の構造

ゼノマウス II に導入したヒト H 鎖遺伝子 (yH) は、約 1,000 kb の大きさの生殖細胞型遺伝子で、 V_H 遺伝子領域は、↑で示した 66 V_H 遺伝子断片、完全な D 領域と J_H 領域、および 3 つの異なる定常部遺伝子 (μ, δ, γ_2) を含んでいる。●：翻訳領域、□：偽遺伝子、*：これまでにゼノマウス II から得られたヒト抗体で使われていた V 遺伝子

図 6 ■ゼノマウス II に導入したヒト κ L 鎖遺伝子の構造

ゼノマウス II に導入したヒト κ L 鎖遺伝子 ($y\kappa$) は、800 kb の大きさの生殖細胞型遺伝子で、 V_{κ} 遺伝子領域は 32 の遺伝子断片 (〵で示された Lp 領域の一部は欠失)、完全な J_{κ} 領域、および 1 つの定常部遺伝子 (C_{κ}) を含んでいる。●：翻訳領域、□：偽遺伝子、*：これまでにゼノマウス II から得られたヒト抗体で使われていた V 遺伝子

図 7 ■ヒト免疫グロブリン遺伝子を導入したマウスの作製

図 8 ■ゼノマウス II の作製

図 9 ■ヒト抗体を作るゼノマウス II

外見は普通のマウスと変わらない。

ーできる YAC クローンを集めた。これらを相同組換えでつなぎ合わせ、巨大遺伝子を再構築した(図 5, 図 6)。YAC 上に再構築したヒト H 鎖遺伝子座には、66 種類の V_H 遺伝子断片、完全な D 領域、 J_H 領域、さらに C 領域 (μ , δ , γ_2) の遺伝子断片が存在する。大きさは 1,020 kb に及ぶ。YAC 上に再構築したヒト κ L 鎖遺伝子座には、32 種類の V_{κ} 遺伝子断片、完全な J_{κ} 領域、さらに C_{κ} 遺伝子断片が存在し、大きさは約 800 kb になる。これら生殖細胞型遺伝子配列のヒト H 鎖、ヒト κ L 鎖遺伝子座を含む巨大 YAC を、それぞれ ES 細胞に導入し、キメラを経て、生殖系列に移行したマウスを得た(図 7)。YAC の ES 細胞への導入は、YAC を含む酵母スフェロプラストと、ES 細胞を融合することによって行なった。融合細胞 2 千万個に 1 個の割合で、YAC が入った ES 細胞を拾うことができた。

このようにしてできたヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスと、マウス免疫グロブリン不活性化マウス (DI マウス) を交配して生まれたのが、ゼノマウス II である(図 8, 図 9)。これは、ヒト H 鎖とヒト κ L 鎖 YAC をもち、マウスの H 鎖と κ L 鎖が不活性化されている。

2. ゼノマウス II の性質

巨大なヒト免疫グロブリン遺伝子座をマウスに導入することにより、ヒト抗体生産システムをマウスで再現することができた。ゼノマウス II の体液性免疫応答は、どのようになっているのだろうか。

a) 成熟 B 細胞のレベル

DI マウスでは、B 細胞の分化はほとんど進んでいない。しかしゼノマウス II では、普通のマウスに近い正常な B 細胞の分化が起こっている。すべての B 細胞では、ヒト IgM を発現しており、そのうち約 60 % がヒト IgD 分子を細胞表面上に発現している成熟 B 細胞である。これは、ヒト免疫グロブリン遺伝子の再編成と、V 遺伝子レパートリーの形成によって、B 細胞の分化が進んだためと考えられる。IgM と IgD を発現している成熟 B 細胞は、骨髄を離れ、リンパ組織を經由して、抗原に遭遇するまで生体内を循環している。

b) アイソタイプスイッチ

成熟 B 細胞は抗原と遭遇すると、H 鎖の VDJ 遺伝子ドメインと、その 3' 側にクラスターを形成して存在している定常部遺伝子 (C_H) の再編成が誘導され、ある一つの抗体クラス (アイソタイプ) を分泌するように運命づけられる。ゼノマウス II の血清中の IgM、IgG のレベルは普通のマウスの値と近く、IgM から IgG へのアイソタイプスイッチは効率よく行なわれていると考えられる。

c) ヒト抗体応答の多様性

ゼノマウス II で発現しているヒト抗体遺伝子のレパートリー解析では、導入したヒト V_H、D、J_H 遺伝子断片の使用頻度は、ヒトでみられるパターンとよく似ている。これらの V_H-D-J_H は、ヒト μ または γ_2 と結合しており、V_H-D-J_H 再編成の際に、結合部で起こる N スクレオチド付加もみられる。最も多様性に富む CDR 3 の長さは 8~19 アミノ酸からなっており、ヒトとよく似ている。 κ L 鎖でも、ヒト V _{κ} 、J _{κ} 遺伝子断片の使用頻度は、ヒトでみられるパターンと類似している。V _{κ} -J _{κ} は、C _{κ} と正しく結合しており、CDR 3 の長さは 9~10 アミノ酸で、これもヒトと一致している。これらの点からも、導入したヒト免疫グロブリン遺伝子がヒトにおけると同様に、マウスのシステムにおいても正常に機能していることがわかる。

3. ゼノマウス II を用いたヒトモノクローナル抗体の作製

a) ヒトモノクローナル抗体の作製

ゼノマウス II で、ヒトの免疫応答がどの程度再構成さ

表 1 ■ゼノマウスを用いたヒトモノクローナル抗体作製の概要

1) ゼノマウスへの免疫
2) ゼノマウスリンパ球細胞とミエローマの融合
3) HAT 培地によるハイブリドーマの選択
4) 抗原特異的ヒト抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング
5) ハイブリドーマのクローニング
6) ハイブリドーマの大量培養
7) ヒトモノクローナル抗体の精製

れているかは、抗体応答を引き出すことのできる抗原のバリエーションと、抗原特異的高親和性モノクローナル抗体のできやすさで推し量ることができる。ヒトインターロイキン (IL)-8、ヒト腫瘍壊死因子 (TNF)- α などの可溶性タンパク質、ヒト上皮成長因子 (EGF) レセプターのような細胞表面抗原を、それぞれゼノマウス II に免疫したところ、抗原特異的なヒト IgG_{2 κ} モノクローナル抗体がそれぞれ 10~25 種類得られた。抗体の親和性はいずれも $10^9 \sim 10^{10}$ /M である。抗ヒト IL-8 ヒトモノクローナル抗体も、抗ヒト TNF- α ヒトモノクローナル抗体も、それぞれ相当するマウス由来の中和抗体と同様にレセプターとの結合を阻害した。また、抗ヒト EGF レセプターヒトモノクローナル抗体は、EGF レセプターを発現している A431 細胞に対する EGF の結合を完全にブロックしている。

ゼノマウス II を用いたヒトモノクローナル抗体の作製には、表 1 に示したようなすでに一般化しているハイブリドーマ技術を用いることができる。ゼノマウス II は、これまで試みたすべてのヒト抗原に対して、強いヒト抗体産生応答を示した。しかも 10^{10} /M の親和性をもつ抗体が得られている。

b) ジーンユースージ

ゼノマウス II に導入したヒトの遺伝子座の遺伝子断片が、どのように利用されているかは興味のあるところである。ヒト IL-8 およびヒト EGF レセプターに対するヒトモノクローナル抗体 (8 種類) の可変部遺伝子には、H 鎖では 5 種類の V_H 遺伝子断片、6 種類の D 遺伝子断片、3 種類の J_H 遺伝子断片が、 κ L 鎖では、3 種類の V _{κ} 遺伝子断片、3 種類の J _{κ} 遺伝子断片が使われており、これらの組み合わせで抗体遺伝子の可変部が構成されている。ゼノマウス II は、これら様々な領域の遺伝子断片を使うことによって、多様な抗体を作り出している。

c) 体細胞突然変異

B 細胞は、膜結合抗体が発現されるようになった後、体細胞高頻度突然変異によって抗体のもつ多様性をさらに拡大させる。そして抗体の親和性成熟を進める。ゼノ

マウスIIでも、体細胞高頻度突然変異による抗体の親和性成熟が起こっている。体細胞高頻度突然変異は、再編成を終えたV領域遺伝子に高頻度にランダムに導入される。発現型のV遺伝子では、抗原との結合に関与する3個所のCDR領域に集中して、アミノ酸配列が変化するような塩基対の変異が生じる。一方、アミノ酸配列が変化しないサイレントな塩基の変異は、フレームワーク領域全域にわたって分布している。

作製したヒトモノクローナル抗体のV_H、V_K遺伝子を、相当するヒトの生殖細胞型遺伝子と比較すると、広範囲に塩基の置換が起こっていることがわかる。ところが、定常部領域ではまったく塩基置換は起こっていない。抗体のV領域における塩基置換のほとんどは、0~12個のアミノ酸配列の変化となり、特にCDR1とCDR2に多くみられる。

4. その他のヒト免疫グロブリントランスジェニックマウス作製の試み

最近、免疫グロブリン遺伝子座のような大きな遺伝子を、マイクロセルを用いてES細胞に導入する方法が報告された⁽¹⁰⁾。これは、YACを用いる方法に比べて、はるかに大きな遺伝子を導入できるという特徴をもっている。H鎖遺伝子を含むヒトの14番染色体、 λ L鎖遺伝子を含む22番染色体、 κ L鎖遺伝子を含む2番染色体の場合はその断片を、それぞれマイクロセルに入れ、ES細胞と融合し、これらの染色体またはその断片をそのままマウスES細胞に導入し、キメラマウスを作ること成功している。約1千万塩基対ほどで、導入したもののなかでは比較的小さい2番染色体断片の場合は、生殖細胞系列を経て子孫まで安定に伝わっているが、残念ながら染色体そのものの生殖細胞系列への移行には成功していない。導入した染色体の安定性などの問題があるようである。したがって、この方法による実用的な完全ヒト抗体を産生するマウスの作製には、まだ時間がかかるようである。

5. ファージディスプレイ

M13ファージは、線状一本鎖DNAを含み、棒状構造をしている。このDNAの中に抗体遺伝子を組み込むことができる。その遺伝子産物は、ファージ粒子を構成する外殻タンパク質との融合タンパク質として発現され、このファージ粒子表面に抗体として提示される。発現された抗体の遺伝子は、ファージ粒子中のDNAにコードされているので、ファージをあたかも抗体産生細胞のように扱える。抗原抗体反応を利用して抗体をコード

する抗体遺伝子を回収することができる。

Bリンパ細胞に由来するcDNAを鋳型として、PCR法により再編成の終わったV_HとV_L遺伝子をそれぞれ増幅するとともに、これらをランダムに組み合わせてファージディスプレイベクターにクローン化することにより、様々な抗原結合部位を提示するファージライブラリーを作製することができる。これは、あらかじめ目的とする抗原で免疫した動物を出発材料として用いると効果的である。たとえば、過免疫したゼノマウスIIから、高い特異性と親和性をもつ抗体を選択するために、ファージディスプレイを使うということもできる。

ファージディスプレイは、抗体の本来の多様性を利用して*in vitro*で多くの抗体を作ることができる。ヒトゲノムからすべてのV_H、V_K、V_L遺伝子を単離し、これらをD、J遺伝子と組み合わせ、巨大なレパートリーからなるライブラリーを作る。つまり、免疫系で起こっている遺伝子の再編成を行なうわけである。これらの遺伝子をファージ粒子のDNAに組み込み、大腸菌に感染させる。抗体の多様性を増加させるために不完全なポリメラーゼをもっている大腸菌を宿主として使えば、ファージ増殖の際、不完全なポリメラーゼは正常なポリメラーゼより高い比率で突然変異を導入することができる。最終的に、ファージ表面に可変部のみからなる抗体をディスプレイする。こうした方法も現在開発されつつある^(11, 12)。

ゼノマウスIIを用いた方法は、免疫後、すでに一般化しているハイブリドーマ法で高親和性のヒト抗体が選択できることから、現時点では最も実用的で優れているといえるであろう。

ヒト抗体の臨床応用

抗体治療が考えられる疾患分野の中で、癌は最も大きなターゲットである。抗体治療研究が始まった初期の頃、癌細胞は、その異常性を示すユニークな分子を、細胞表面上に提示しているのではないかという期待が大きかった。もしそのような癌特異的な抗原が見つけれたら、それをターゲットに癌治療が行なえるからである。しかし残念ながら、そのような都合のよい抗原はいまだに同定されていない。ヒトの癌細胞表面上に存在するほとんどの抗原は、正常細胞にもみられている。

ただ、正常細胞と癌細胞では、細胞表面上に存在する特定の分子の発現量に大きな差がある場合がある。抗体による傷害が、正常細胞では可逆的だが、癌細胞にとっては不可逆的に起こる場合がある。このような差は、正

表 2 ■ 主な癌関連抗原

リンパ腫/白血病
分化抗原 (CD19, CD20, CD33, CD45, CAMPATH-1 など)
固形癌
細胞表面抗原
糖タンパク質 (CEA, TAG-72, Ep-CAM, A33, MUC1, G250 など)
糖脂質 (ガングリオシド GD2, GD3 など)
糖鎖 (Le ^x など)
増殖因子受容体 (EGFR, p185 ^{HER2} など)
間質性抗原 (FAP- α)
内皮/血管 (エンドセリン, VEGF, α V β 3 など)
細胞外 (メタロプロテイナーゼ)

常細胞と癌細胞を識別するために重要である。また、癌細胞を直接ターゲットにする以外に、癌の増殖に必要な細胞や分子をターゲットにする場合がある。たとえば、増殖因子などに対する中和抗体を用いる場合である。また、癌細胞間の間質細胞や結合組織をターゲットにすることもできる。こうして数多くの試みがなされてきている。表 2 には、抗体のターゲットとされている代表的な癌関連抗原を示す^(13, 14)。

抗体を用いた癌細胞の攻め方には、2つの異なった方法がある。抗体自身が癌細胞を破壊するか、抗体を殺癌物質の運搬手段として考えるかである。後者に用いられる殺癌物質としては、ヨード 131, イットリウム 99 などのラジオアイソトープがある。これらは、癌細胞の DNA を損傷して癌細胞を殺すことができる。また、トキシシンを使う方法もある。たとえば、トウゴマ種子に含まれる猛毒性の糖タンパク質のリシンで、タンパク質合成を阻害する。制癌剤にもしばしばこの目的で用いられる。また、抗体と結合した酵素で、毒性のないプロドラッグを、癌組織でのみ活性化できるようにすることもできる。炎症反応をひき起こし、癌組織を破壊できる TNF などの炎症性分子や、アンチセンス DNA の利用も考えられている。抗体を用いて T 細胞を癌組織に誘導し、癌細胞を溶解させるといった戦略も試みられている^(15, 16)。

こうした多くの試みも、マウス抗体では免疫原性による限界があった。しかし、最近のドラマチックなヒト抗体作製技術の開発が、親和性の改善、免疫原性の顕著な減少などに結びつけば、この分野での急速な発展が大いに期待できる。

*

ヒト抗原に対する高い親和性をもつヒト抗体の作製が可能になった。また、その生産手段としてのゼノマウス II も実用レベルになっている。この意義は非常に大き

い。マウスモノクローナル抗体またはそれを改良した抗体であれば避けられない免疫原性の問題やアレルギー応答を、完全ヒト抗体は最小限にすることができるであろう。そのため、投与した抗体の効果や安全性の増加が期待できる。慢性で再発しやすいヒトの病気、たとえば炎症、自己免疫疾患や癌など、反復投与が必要な病気の治療に使える抗体として利用できるであろう。

ゼノマウス II は IgG₂ タイプのヒト抗体しか作らない。適応症によっては異なるエフェクター機能をもつアイソタイプも必要になってくる。ゼノマウス II が作るヒト IgG₂ 抗体は、これまでの分子生物学的手法を用いて他のアイソタイプに容易に変換できる。しかし実用的な面からは、個々のアイソタイプ抗体を産生できるゼノマウスの各バージョンの作製が望まれる。これらは現在開発が続けられている。

謝辞：本稿執筆の機会を与えていただきました井上國世京都大学教授に心より御礼申し上げます。

文献

- 1) 井上國世：化学と生物, 34, 240 (1996).
- 2) C. McNeil : *J. Natl. Cancer Inst.*, 87, 1658 (1995).
- 3) 笹月健彦(監訳)：“免疫生物学”，南江堂, 1995.
- 4) 野口 浩：医学のあゆみ, 167, 457 (1993).
- 5) 中谷知右, 野口 浩：ファルマシア, 33, 24 (1997).
- 6) M. Neuberger & M. Brüggemann : *Nature*, 386, 25 (1997).
- 7) 岡田 齊, 野田哲生：実験医学, 14, 2710 (1996).
- 8) M.J. Mendez *et al.* : *Nature Genet.*, 15, 146 (1997).
- 9) 西 義介：日経サイエンス, 6月号, 40 (1995).
- 10) K. Tomizuka *et al.* : *Nature Genet.*, 16, 133 (1997).
- 11) 鶴下直也：ファルマシア, 33, 19 (1997).
- 12) 黒沢良和：臨床免疫, 28, 1077 (1996).
- 13) A.M. Scott & J. Cebon : *Lancet*, 349 (suppl II), 19 (1997).
- 14) A.M. Scott & S. Welt : *Curr. Opin. Immunol.*, 9, 717 (1997).
- 15) L.J. Old : *Sci. Am.*, Sep., 136 (1996).
- 16) A. Furano, A.L. Horenstein & F. Malavasi : *J. Biol. Regulat. Homeost. Agent.*, 10, 72 (1996).