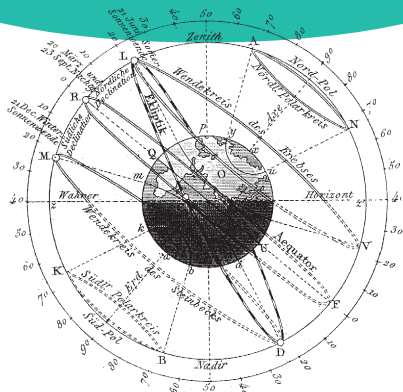


## 【解説】



# モノクローナル抗体取得技術の新展開

## より良い抗体をより早く

加藤晃代\*<sup>1</sup>, 中野秀雄\*<sup>2</sup>

モノクローナル抗体は、ある特定の抗原決定基（エピトープ）を認識し結合する単一の抗体であり、その特性を活かし、診断や医薬用途で幅広く利用されている。近年、モノクローナル抗体の需要は増しており、さまざまな抗体取得技術が開発されてきている。本稿ではそれらの新技术を包括的に紹介するとともに、われわれのグループが開発した、モノクローナル抗体の迅速取得技術である Ecobody 法を解説する。

### はじめに

抗体はポリクローナルとモノクローナルに分けられる。前者は、さまざまなエピトープを認識する複数のクローンからなる混合物であり、ウェスタンブロッティングや Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) などの免疫学的実験では身近な存在である。たとえば、「抗マウス IgG 抗体（ウサギ）」というものは、マウス IgG を認識するウサギ由来のポリクローナル抗体であることが一般的である。このような抗体は、抗原で免疫された

動物の血清から免疫グロブリン画分を精製することにより製造される。

一方で、モノクローナル抗体とは、単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られた抗体であり、単一の抗原決定基に対する高い特異性と親和性を有することを特徴とする。後述するようなモノクローナル抗体取得技術により獲得した単一の抗体分子を、動物細胞やマウスで発現させることにより、変わらない品質の抗体を半永久的に生産することができる。高品質で狙いどおりの効果が得られやすいことから、医療において臨床診断薬や医薬品として用いられるだけでなく、研究において分析・定量・分離・精製用途としても利用されている。

### 抗体の構造と機能

抗体は2本の重鎖（H鎖）と2本の軽鎖（L鎖）からなるポリペプチドであり、一般的にY字型の構造で示される。Y字の先端部分はFab、柄の部分はFcと呼ばれる（図1）。われわれが実験に使用する抗体はマウス、ウサギ、ラットおよびヤギなどの動物由来であることが多いが、動物種によりその抗原認識性やアイソタイプが

Development in Screening Strategies for Monoclonal Antibodies: Get Better Antibodies, More Rapidly  
Teruyo OJIMA-KATO, Hideo NAKANO, \*<sup>1</sup>名城大学農学部（日本学術振興会特別研究員）、\*<sup>2</sup>名古屋大学生命農学研究科

## ◇◇◇ コラム ◇◇◇

抗体は動物の体内で自身を異物から守るために作られており、異物に結合して排除するために役立っている。個々の抗体分子と抗原の結合反応は鍵と鍵穴のように厳密であるため、ある特定の物質を検出するための研究試薬だけでなく、診断薬や治療薬としても今や必要不可欠な道具として利用されている。皆さんに身近なのは、インフルエンザの検査だろうか。インフルエンザに対する抗体を用いた「イムノクロマト」というキットを使うと、医師に鼻水やのどの粘液を採取してもらい15分程度待っていると「あなたはA型インフルエンザにかかっています」などの診断が下りる。

ただし、このような厳密な検査に利用できる抗体は、抗原に対する高い特異性と親和性を有していなければならないため、それを動物のB細胞一つひとつから探し実用化するためにはたいへんな時間と労力を要する。現在よく用いられている方法は、1975年に考案された「ハイブリドーマ法」というもので、数カ月かけてマウスのB細胞から目的のモノクローナル抗体を選択する。さまざまな病気の診断や高感度な

薬物検出を行うためには、質の良い抗体をより短時間で簡便に取得し、安価に製造するための技術開発が望まれている。

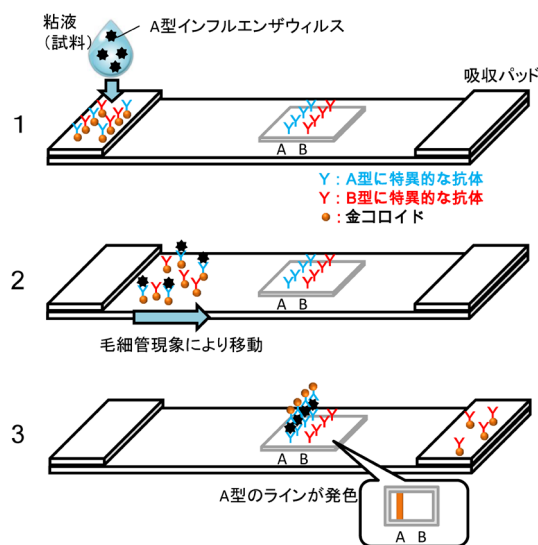


図 ■ 身近に利用される抗体  
インフルエンザ検査用のイムノクロマトキット

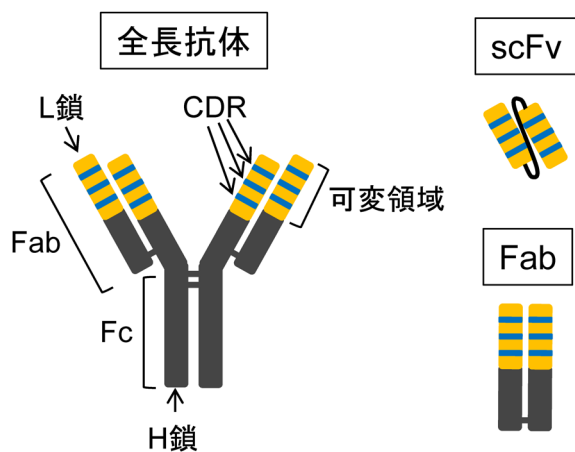


図1 ■ 抗体の基本構造

さまざまであることから、鳥類やロバ、魚などの抗体が用いられる場合もある。

モノクローナル抗体の高い抗原認識能および多様性は、抗体分子先端部の可変領域に存在する相補性決定領域 (Complementarity Determining Region; CDR) に支えられている。H鎖とL鎖にそれぞれ数~10アミノ酸残基程度の3つのCDR領域 (CDR1~3) が存在し、その配列の多様性が動物種およびクローンによって異なる。ウサギモノクローナル抗体はマウスのものよりも親和性・特異性ともに高いといわれているが、それはウサギ

抗体CDRの長さがマウスのそれよりも長く、多様性に富んでいることに起因する。

抗体分子として結合活性を有する最小の抗体人工分子はVHとVLをリンカー配列 (例: GGGGS×3) でつなげた一本鎖抗体 (single chain Fv; scFv) である。しかし配列によって安定性が大きく異なり、不安定な分子も多いことが知られている。それに対しFabは、scFvと比較して安定性・抗原親和性ともに優れており、全長のIgGと比較して低分子であるため、大腸菌による生産を目的とした技術開発が盛んに行われている。

### モノクローナル抗体取得技術開発の幕開け

さて、モノクローナル抗体取得技術といえば1975年にKöhlerとMilsteinにより開発されたハイブリドーマ法が最も有名である<sup>(1)</sup>。モノクローナル抗体を産生するマウス由来B細胞とがん細胞であるミエローマ細胞を融合することにより、*in vitro*で特定の抗体を産生できるようになった。すなわち、本来分裂回数に制限のあるB細胞が不死化され、モノクローナル抗体を細胞外へ分泌しながら増殖するため、培養上清の抗体活性を調べることにより目的のクローンを選択することが可能となった。樹立したハイブリドーマをマウスに投与し腹水化し

た後、そこからアフィニティ精製することによりモノクローナル抗体を取得する。

ウサギやヒトのミエローマ細胞も開発され、マウス以外のハイブリドーマ法も可能となったが<sup>(2,3)</sup>、B細胞とミエローマ細胞の融合効率の低さや生存不安定さなどの課題が残っている。そのため、現在でもなおマウスハイブリドーマ法がモノクローナル抗体取得技術の主流である。しかしながら、多大な時間と労力が必要であることは否めない。

## ディスプレイ法

ハイブリドーマ法とは異なる抗体取得技術として、ファージディスプレイ法<sup>(4)</sup>、リボソームディスプレイ法<sup>(5)</sup>、酵母ディスプレイ法<sup>(6)</sup>などが開発されている。

なかでも、抗体取得法として最も実績があるのは1985年にG. Smithにより報告されたファージディスプレイ法であろう。本手法は、バクテリアに感染するバクテリオファージの表面に抗体フラグメント (scFv または Fab) を提示させ、1) 固定化した標的分子とファージの反応、2) 洗浄、3) 標的分子に結合したファージの回収、4) 回収ファージによる大腸菌感染とファージライブラリの増幅・再構築、のステップからなるパニングと呼ばれる操作を3~5回繰り返す。標的分子に対して特異的に相互作用する抗体提示クローンを見つけ出すというものである。

ある特定の抗原で免疫された動物の抗体遺伝子をライブラリ化し利用することもできるが、CDRの塩基配列を完全にランダム化した人工ライブラリを材料とすることもできる。抗体医薬品候補のスクリーニングには、完全ヒト型抗体ライブラリが用いられる。ファージディスプレイ法で開発された抗体医薬として有名なのは、関節リウマチ患者に適用可能なヒト型抗ヒトTNF $\alpha$ モノクローナル抗体であるアダリムマブ (ヒュミラ) であり、日本では2008年に承認されている。

ただし、このような人工ライブラリを用いたディスプレイ法で所望の抗体取得に成功する可能性は、ファージ抗体ライブラリの質に大きく依存する。また、動物の免疫システムにより作られるナイーブなHとL鎖のペアからなる抗体を取得することは困難である。

## シングル細胞由来抗体の取得法

一方で、抗体産生B細胞ひとつひとつを出発材料とした抗体取得法は、ファージディスプレイ法などと異なり、

抗体のL鎖とH鎖のペアを同時に取得できるため、生体内で実際に作られている抗体の取得や研究には欠かせない。

ヒトのナイーブB細胞由来抗体取得技術として、Steinitzらにより開発されたエプスタイン・バーウイルス (EBウイルス) 法が知られている<sup>(7)</sup>。ヒト血液から回収したB細胞にEBウイルスを感染させ不死化し、増殖・抗体産生を誘導し、最終的にChinese Hamster Ovary (CHO) 細胞のような動物細胞に抗体を産生させ評価するというものである。日本のイーベック社が本法を完全ヒト型抗体医薬探索法として実用化している。

また、動物から得られるB細胞1個から抗体遺伝子を増幅し、その後上記同様にCHO細胞やHEK293細胞のような動物細胞で発現させ抗体性能評価を行う、不死化工程なしでB細胞から直接かつ短時間に抗体を取得する技術も、富山大学やロシュのグループより報告されている<sup>(8-10)</sup>。

テキサス大学のグループからは、次世代シーケンサーとバイオインフォマティクスを駆使した抗体取得法も報告されている<sup>(11)</sup>。本方法では、フローサイトメーターによりB細胞を1細胞ずつに分離した後、磁気ビーズでmRNAを捕捉する。次に、ごく微量のエマルジョン内反応系でLおよびH鎖の情報がリンクする形となるように1細胞由来の抗体遺伝子を増幅、次いで次世代シーケンサーで解析し、その相対頻度に基づいてLおよびH鎖ペアを組み合わせる。最後に、得られた遺伝子情報からIgG遺伝子抗体を合成し、HEK293細胞で発現させ抗体性能を評価する。彼らは、 $6.8 \times 10^5$ ものヒトB細胞の情報を次世代シーケンサーで一度に解析し、目的抗原に対して高い親和性の抗体取得に成功している。

## 無細胞タンパク質合成系

無細胞タンパク質合成系 (Cell-free protein synthesis system; CFPS) とは、生細胞ではなく、試験管内でタンパク質を合成するシステムである。大腸菌、小麦胚芽、網状赤血球、昆虫培養細胞などより抽出した、リボソーム、翻訳因子、tRNAおよびアミノアシルtRNAシンターゼを含む抽出液と、DNAあるいはmRNA、およびATPなどのエネルギー源を混合することにより1時間程度でタンパク質を生合成することができる。

無細胞タンパク質合成系を用いた抗体スクリーニングシステムとしては、遺伝子とそこから合成されるタンパク質とを物理的に結合させたディスプレイ技術であるリボソームディスプレイが代表的である。リボソームを介

## 迅速抗体取得技術「Ecobody法」

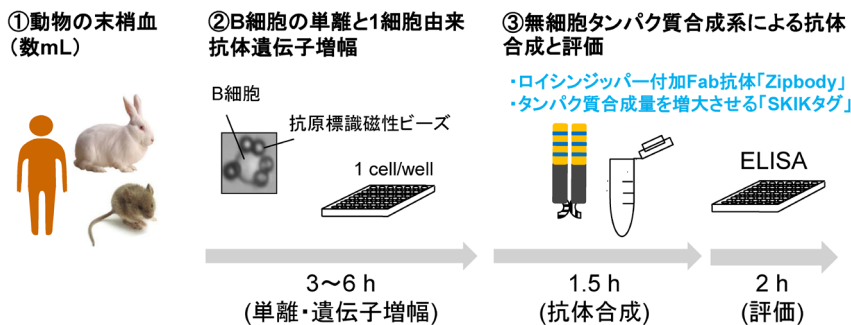
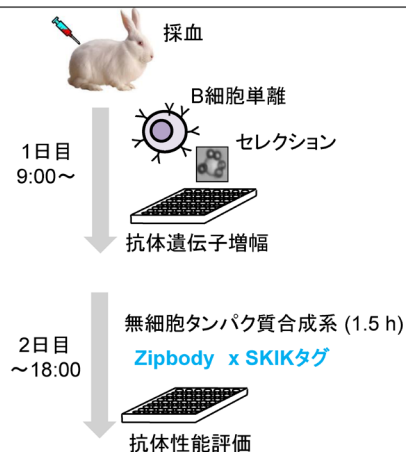


図2 ■ Ecobody法の概要

### B細胞単離から抗体評価までの流れ



### 取得抗体の評価例 (ELISA)

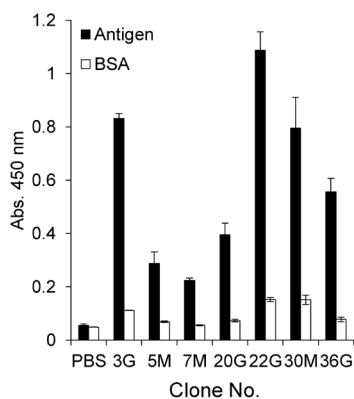


図3 ■ Ecobody法によるウサギモノクローナル抗体の取得例

してmRNA（遺伝子型）とタンパク質（表現型）が結合した複合体を *in vitro* で作り出し、ファージディスプレイ法と同様のパンニング操作により洗浄と濃縮を繰り返して、高い親和性を有する分子を取得する手法である。解析可能なライブラリーサイズが、 $10^{12}/\text{mL}$  程度と非常に大きいことが特徴である。最近では、RNaseやプロテアーゼが含まれていない再構成系の大腸菌無細胞タンパク質合成系であるPURE systemを用いることで、mRNA-リボソーム複合体の形成効率が向上し、scFvやFab抗体を効率的にスクリーニングできることが報告されている<sup>(12)</sup>。

### 迅速抗体取得技術Ecobody法

一方で、われわれはB細胞からの直接的な抗体遺伝子増幅と、無細胞タンパク質合成系によるFab合成を組み合わせた、迅速な抗体取得法を開発してきた<sup>(13, 14)</sup>。本法においては、抗原結合能のあるB細胞からL鎖およびH鎖の変換領域を逆転写反応とPCRにより増幅した

後、無細胞タンパク質合成系に必要なT7プロモーター配列やT7ターミネーター配列を付加し、再び混合したものを鋳型DNAとして、無細胞タンパク質合成系によりFab断片を合成する。その後ELISAなどで抗体性能を評価する。この手法の最大の特徴は、B細胞単離以降の操作がすべて *in vitro* で行われ、煩雑な操作や動物細胞の培養を伴わないため、迅速化・自動化が可能という点である。

われわれはこの手法により、種々の病原微生物に対するウサギモノクローナル抗体の取得を試みた。具体的な手順は以下のとおりである。1) 不活化した抗原で免疫したウサギの末梢血からB細胞画分を回収する。2) 抗原でコーティングした磁性ビーズにより抗原結合能のあるB細胞を単離する。3) 1細胞/1ウェルとなるよう分離し、1細胞逆転写反応とPCRにより抗体遺伝子を増幅する。4) 大腸菌無細胞タンパク質合成系に必要なDNA配列を付加する。5) 無細胞タンパク質合成系によりFabを合成し、ELISAで評価する。

しかしながらこの研究開発の過程で、抗体クローンに

より無細胞タンパク質合成系におけるFabの形成能が大きく異なり、同じ動物種より得られるものであっても、クローンによっては難なくFabが形成されるものもあれば、ほとんどFabが形成されない場合もあることがわかった。その主な原因は、1) FabのL鎖とH鎖が会合せず、分子間ジスルフィド結合が掛からない。さらに2) 会合以前の問題として、タンパク質合成量が少なすぎる（またはL鎖とH鎖とで差がある）、の2点であった。得られたクローンを正しく評価するためには本課題を克服する必要がある。

そこで、まずL鎖とH鎖の会合を促進するために、それぞれのC末端側に30アミノ酸残基程度からなる接着性のペプチドペア、ロイシンジッパーを付加した「Zipbody」を考案した。ロイシンジッパーはヘリックス構造を取り、お互いに解離定数 $10^{-8}$  M程度の親和性でヘテロダイマーを形成するといわれている。すると、Zipbody化することにより、従来大腸菌の無細胞タンパク質合成系で活性型として得られなかったFabを活性型として得ることが可能となった。さらに、大腸菌の細胞内発現系においても有効であり、これまでに、マウス、ウサギおよびヒト由来の抗体遺伝子において、Zipbody化によるFab形成向上効果が認められている<sup>(45)</sup>。

タンパク質合成量が少ない、という第二の課題に対して、われわれは大腸菌で高発現なタンパク質のN末端アミノ酸配列傾向を報告するBivonaら<sup>(16)</sup>の論文からヒントを得、Ser-Lys-Ile-Lysからなる4アミノ酸のタグ「SKIKタグ」をN末端に付加するのみで従来難発現であった抗体の発現量を増大可能であることを見いだした<sup>(17)</sup>。本タグを付加することにより、H鎖とL鎖の発現量が増大するとともに、両者の合成量をそろえることができ、無細胞系においてZipbodyを安定的に合成・評価することが可能となった。

ZipbodyとSKIKタグの開発により、従来の技術課題を克服し、シングルB細胞の単離から無細胞タンパク質合成系による合成・評価までを僅か2日で完了し、目的の抗体を取得できることを確認した（図2, 3）。われわれは本手法を「Ecobody法」と名づけ、現在はウサギからの抗毒素抗体や、ヒトからのさまざまな抗体取得に取り組んでいる。

### 大腸菌によるモノクローナル抗体の生産

一般的に、モノクローナル抗体は、上述したようなCHO細胞やHEK293細胞のような動物細胞により生産・製造される。最近では、大腸菌や酵母などの微生物

による生産も盛んに研究されており、Robinsonらにより、改良した大腸菌株を用いて抗体全長を生産する技術も報告されている<sup>(18)</sup>。微生物による抗体生産の魅力は、低コストで簡便かつ迅速な点である。しかしながら、抗体クローンによって生産量や活性が異なることは、大きな課題である。

そんななか、上述したN末端SKIKタグは大腸菌の無細胞タンパク質合成系のみならず、大腸菌と酵母生細胞においてもタンパク質発現量増大効果を発揮することが明らかとなった。ある抗体クローンではN末端にSKIKタグを付加するのみで大腸菌におけるタンパク質生産量を約30倍にも増大することができた。タンパク質のN末端側の遺伝子配列がその発現に影響することは知られていたが<sup>(19)</sup>、このような簡単な方法でタンパク質発現量増大が可能であることは、特筆すべきことである。

われわれは、このSKIKタグを付加したZipbodyを大腸菌内で大量に生産し、活性型抗体として取得するための技術開発も行っている。これまでに、1Lの大腸菌培地から解離定数500 pM程度のウサギ由来Zipbodyを数~10 mg精製・回収することに成功しており、さらなる技術改良を進めている。

Zipbodyは全長抗体と比較して低分子であるため、本利点を活かし、Zipbodyに酵素を遺伝子的に融合した「Zipbodyzyme」の開発と大腸菌による生産法の開発も進めている<sup>(20)</sup>。これまでに、Zipbodyとさまざまな酵素の融合体が、抗体および酵素活性を維持したまま大腸菌で生産できることがわかってきた。

上述したEcobody法によるモノクローナル抗体の取得から大腸菌によるZipbodyzyme生産スキームを確立することにより、将来的にモノクローナル抗体を用いたさまざまなバイオアッセイがより簡便かつ手軽に利用できるように、研究開発を進めていく予定である。

### おわりに

モノクローナル抗体の用途は今後も拡大していくと考えられ、より良い抗体をより早く取得し、さらに、安価に製造する技術の開発が望まれる。それぞれの手法に得手・不得手が存在するが、今後の技術的成熟とともに、抗体を用いた検査・診断さらには医薬品がより身近になることを期待したい。

### 文献

- 1) G. Köhler & C. Milstein: *Nature*, **256**, 495 (1975).
- 2) H. Spieker-Polet, P. Sethupathi, P. C. Yam & K. L.

- Knight: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9348 (1995).
- 3) R. H. Zubler, F. Erard, R. K. Lees, L. M. Van, C. Mingari, L. Moretta & H. R. MacDonald: *J. Immunol.*, **134**, 3662 (1985).
  - 4) G. P. Smith: *Science*, **228**, 1315 (1985).
  - 5) C. Zahnd, P. Amstutz & A. Pluckthun: *Nat. Methods*, **4**, 269 (2007).
  - 6) S. A. Gai & K. D. Wittrup: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**, 467 (2007).
  - 7) M. Steinitz, G. Klein, S. Koskimies & O. Makel: *Nature*, **269**, 420 (1977).
  - 8) A. Jin, T. Ozawa, K. Tajiri, T. Obata, S. Kondo, K. Kinoshita, S. Kadowaki, K. Takahashi, T. Sugiyama, H. Kishi *et al.*: *Nat. Med.*, **15**, 1088 (2009).
  - 9) N. Kurosawa, M. Yoshioka, R. Fujimoto, F. Yamagishi & M. Isobe: *BMC Biol.*, **10**, 80 (2012).
  - 10) S. Seeber, F. Ros, I. Thorey, G. Tiefenthaler, K. Kaluza, V. Lifke, J. A. Fischer, S. Klostermann, J. Endl, E. Kopetzki *et al.*: *PLoS ONE*, **9**, e86184 (2014).
  - 11) B. J. DeKosky, G. C. Ippolito, R. P. Deschner, J. J. Lavinder, Y. Wine, B. M. Rawlings, N. Varadarajan, C. Giesecke, T. Dörner, S. F. Andrews *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 166 (2013).
  - 12) T. Kanamori, Y. Fujino & T. Ueda: *Biochim. Biophys. Acta*, **1844**, 1925 (2014).
  - 13) X. Jiang, H. Suzuki, Y. Hanai, F. Wada, K. Hitomi, T. Yamane & H. Nakano: *Biotechnol. Prog.*, **22**, 979 (2006).
  - 14) T. Ojima-Kato, D. Hashimura, T. Kojima, S. Minabe & H. Nakano: *J. Immunol. Methods*, **427**, 58 (2015).
  - 15) T. Ojima-Kato, K. Fukui, H. Yamamoto, D. Hashimura, S. Miyake, T. Hirakawa, T. Yamasaki, T. Kojima & H. Nakano: *Protein Eng. Des. Sel.*, **29**, 149 (2016).
  - 16) L. Bivona, Z. Zou, N. Stutzman & P. D. Sun: *Protein Expr. Purif.*, **74**, 248 (2010).
  - 17) T. Ojima-Kato, S. Nagai & H. Nakano: *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 540 (2017).
  - 18) M. P. Robinson, N. Ke, J. Lobstein, C. Peterson, A. Szkodny, T. J. Mansell, C. Tuckey, P. D. Riggs, P. A. Colussi, C. J. Noren *et al.*: *Nat. Commun.*, **6**, 8072 (2015).
  - 19) D. B. Goodman, G. M. Church & S. Kosuri: *Science*, **342**, 475 (2013).
  - 20) 中野秀雄, 森 昭博, 加藤晃代: 特願2016-152447

## プロフィール



## 加藤 晃代 (Teruyo Ojima-KATO)

<略歴>2008年名古屋大学生命農学研究科修士課程修了/日本食品化工株式会社/2012年愛知県「知の拠点あいち 重点研究プロジェクト2」研究員/2016名古屋大学生命農学研究科・名城大学総合研究所研究員/2017年名城大学農学部(日本学術振興会特別研究員), 現在に至る<研究テーマと抱負>微生物やタンパク質の産業応用に向けた研究, 有用タンパク質探索・合成に関する研究<趣味>レモン育て



## 中野 秀雄 (Hideo NAKANO)

<略歴>1991年東京大学大学院工学系研究科博士課程単位取得退学, 博士(工学)/名古屋大学農学部助手/1995年同助教授/2005年同大学大学院生命農学研究科教授, 現在に至る<研究テーマと抱負>タンパク質工学. 特に無細胞タンパク質合成系と一細胞・一分子スクリーニング技術を組み合わせたタンパク質分子創製技術の実用化<趣味>卓球, ジョギング

Copyright © 2017 公益社団法人日本農芸化学会

DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.55.490