

## DNA免疫法による抗体の作製

小林 岳史

1992年に米国のTexas大学のグループはDNAワクチンの手法を活かして、抗原タンパク質の免疫に依存しないDNA免疫法の開発に成功したり、当社はこの技術を開発させたGenovac社(Freiburg ドイツ; www.genovac.com)から技術導入を行い、2004年より横浜研究所において抗体の受託作製を開始し、日本国内で180件以上のプロジェクトを実施した。他の抗体作製技術に見られないユニークな特徴を持つ抗体作製技術としてDNA免疫法を紹介したい。

DNA免疫による抗体作製法は、標的分子のcDNAを適当な哺乳動物細胞用発現ベクターに組み込み、そのベクターを直接免疫動物に投与することによって免疫反応を誘起させ、抗体を作製する技術である。投与された遺伝子のほとんどは筋細胞・線維芽細胞に導入されるが、一部は樹状細胞に導入されると考えられ、これらの細胞が導入された遺伝子を抗原タンパク質として発現し、液性免疫応答が惹起されることを利用している。この技術の特徴は

- ・ 精製抗原を必要としない
- ・ 免疫動物体内の翻訳後修飾システムを利用することから標的分子の立体構造を認識する抗体が得られる
- ・ 分子免疫学手法の応用<sup>2,3)</sup>によって、免疫応答性の誘起や免疫原性の増強が可能

という点があげられる。

## DNA免疫法の概要

実際の手法は複数のステップを経て行われる。下記にそのステップを示す。

## 1. Feasibility study

*In silico*による抗体作製戦略の構築

↓

## 2. クローニング

標的分子のcDNAを発現ベクターへクローニングする。

↓

## 3. 発現確認

哺乳細胞へトランスフェクション後、細胞表面における発現レベルをフローサイトメーターで確認する。

↓

## 4. 免疫

発現ベクターを動物へ導入する。

↓

## 5. 抗血清の回収

標的分子発現細胞を用いてサンプリングした抗血清のtiterをフローサイトメーターで確認する。

↓

## 6. ハイブリドーマ細胞の作製とスクリーニング

免疫動物から回収したB細胞とミエローマ細胞を融合させた後、フローサイトメーターを用いて、標的分子発現細胞に反応するクローンのスクリーニングを行う。

まず最初に *in silico* での標的分子に対する調査を行い、免疫戦略を検討する。この免疫戦略から選択した標的分子の免疫領域cDNAを適当な哺乳動物細胞用の発現ベクターにインサートする。この際に使用する発現ベクターは、標的分子を細胞表面にルーティングさせ、かつ細胞表面に留まらせるように設計してある。加えて、本ベクターには予めタグ配列を付加してある。次に、免疫時の標的分子の抗原性を判断するため、フローサイトメーターを用いて一過性発現させた哺乳動物細胞における細胞表面における発現レベルを確認する。(この段階では、抗タグ抗体を用いて、標的分子の発現確認が可能である。)この発現確認の結果によって、その後の免疫以降のステップの結果を推測することが可能になり、また発現レベルによっては複数の発現ベクターからより標的分子に適した発現ベクターを選択する。液性免疫を惹起する上で標的分子が細胞外または細胞膜表面上に発現し、抗原提示を行うことが重要であり、標的分子の発現量に加えて、局在性の確認が抗体生産の可否を大きく左右する。標的分子の局在性は、permeabilize 処理をした細胞と処理をしていない細胞と抗タグ抗体を組み合わせることで図1のように確認が可能となる。

次は適切な *in vivo* 遺伝子導入法を用いて、作製した哺乳動物細胞用発現ベクターを免疫動物に投与する。*In vivo* の遺伝子導入法は最適化されるまで、非常に不安定な結果をもたらすが、逆に最適化された手技を確立させることによって、非常に安定した免疫が可能となる。

前述したように、作業の後半は従来のモノクローナル抗体作製技術と基本的に同様である。しかし変性していない native form 抗原、言い換えれば高次構造を保持した

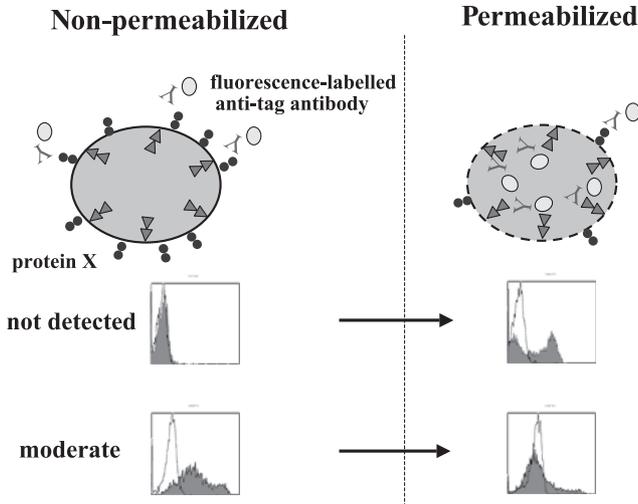


図1. 哺乳細胞における発現タンパク質の局在確認. Permeabilize 処理を行うことにより抗 tag 抗体を細胞内に透過させ、フローサイトメーターで評価することによって、細胞表面もしくは細胞内での発現確認を行う。膜貫通型タンパク質の場合はN末端とC末端にそれぞれ異なるタグをつけて評価する場合もある。

抗原を特異的に認識する抗体を回収したいのであれば、ハイブリドーマ細胞のスクリーニングの過程においても native 構造を保持した抗原を調製する必要がある。変性抗原を利用した抗体解析法では、native 抗原を用いた抗体作製の DNA 免疫法でも、変性抗原に親和性の高いクローンを樹立する確率が高くなってしまふ。そこで、この後半のモノクローナル抗体樹立作業には、目的タンパク質を発現している哺乳動物細胞を利用した解析系でスクリーニングを行う必要がある。つまり、ターゲット抗

原が膜タンパク質であれば、一過性発現させた哺乳動物細胞もしくは標的分子を発現しているがん細胞などを利用し、フローサイトメーターでのスクリーニングを行うことによって、native 抗原を認識するハイブリドーマ細胞の樹立が可能となる。

### DNA 免疫法の特徴

通常法では作製が困難な標的分子に対しても DNA 免疫法での作製が可能となるケースとして下記の3点を紹介したい。

#### 1) 相同性の高い標的分子に対する抗体作製が可能

前述した分子免疫学的手法の応用、具体的には発現ベクターを、工夫を施すことによって相同性のきわめて高い、もしくは免疫動物からクローニングされた標的分子に対する抗体作製が可能となる。図2はマウスからクローニングした標的分子に対する抗体をマウスで作製した事例である。免疫増強シグナル (Immunogenicity enhancing element : IEE) を用いることで抗体を作製することが可能となる。

#### 2) 抗 GPCR 抗体や機能性抗体の作製が可能

GPCR は治療用抗体や診断薬用途での産業応用に結びつく重要な標的分子と考えられているが、通常法では特異性や機能性のある抗体は作製が難しい場合がある。DNA免疫法の場合は、免疫からモノクローナル抗体のスクリーニングの過程までに変性抗原を用いなければ、GPCR のような複雑な立体構造を持つ標的分子に対する有用な抗体を作製することが可能である。

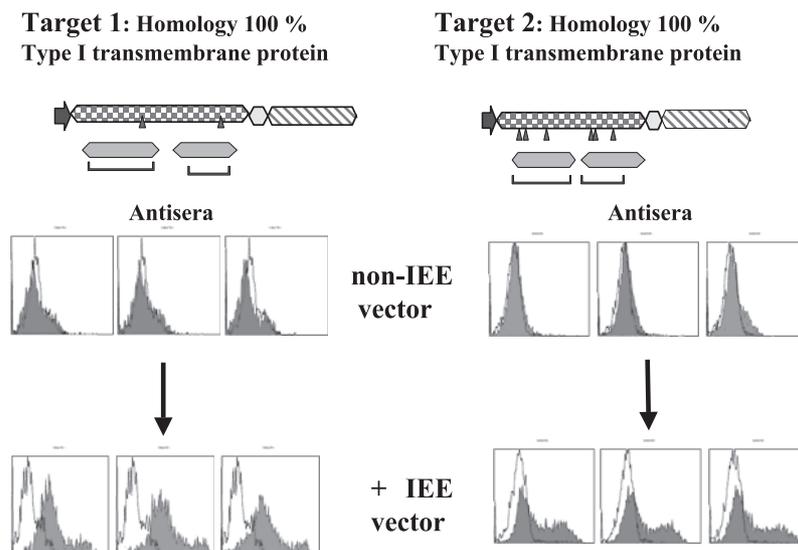


図2. ホモロジーの一致する標的分子の抗体作製. Target1, Target2ともにマウスからクローニングされた遺伝子である。免疫増強シグナル (IEE) を付加しないベクターでマウスに免疫を試みたが3個体いずれも抗体の生産は確認できなかったが、IEEを付加したベクターでは3個体いずれも生産を確認できた。

表1. DNA免疫法による抗体作製の成功率

標的分子の局在性	成功率 (n = 322)
分泌型タンパク質	88%
1回膜貫通タンパク質	92%
複数回膜貫通型タンパク質	52%
細胞内タンパク質	73%

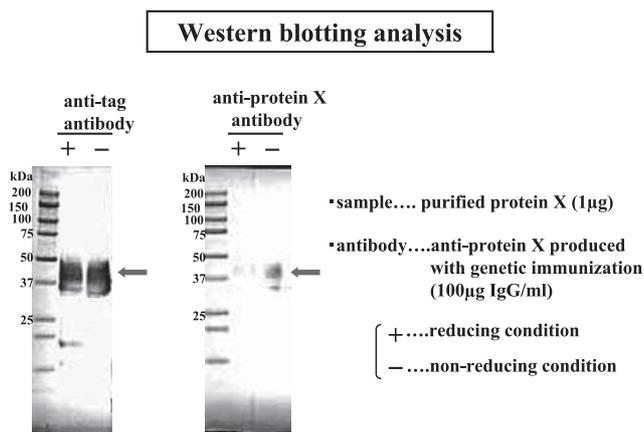


図3. 変性抗原は認識しない。タグを付加した組換えタンパク質を2-ME処理とボイルを行った場合(+)としなかった場合(-)のレーンそれぞれを抗タグ抗体で検出すると両レーンともバンドを確認できる。一方、DNA免疫法で作製した抗体は2-ME処理とボイルを行わなかったレーン(-)のみバンドを確認できる。

一過性/安定発現させた哺乳動物細胞や、がん細胞などの標的分子発現細胞を用いたフローサイトメーター解析によるスクリーニングによって、機能性抗体も作製に成功している<sup>4,5)</sup>。

しかしながら表1の通り、弊社とGenovac社で実施したDNA免疫法による抗体作製においては、分泌型タンパク質および1回膜貫通型タンパク質での抗体作製成功率が90%以上であったのと比較すると、複数回膜貫通型タンパク質50%前後となり、技術改善の余地が残されている。

### 3) ネイティブフォームのタンパク質を認識する抗体の作製が可能

DNA免疫法で作製された抗体の使用目的として、図3の通り、ウエスタンブロッティングなどの変性状態にある標的分子への結合を期待する場合は不向きであり、フローサイトメーターや*in vivo*試験系での評価などには向いている。過去の実施したプロジェクトから、DNA免疫法で作製した抗体は、ジスルフィド結合の保持、膜貫通領域を介した高次構造の維持、糖鎖などの発現後修飾などの立体構造上のエピトープを認識する抗体の作製には

適していると言える。高い特異性や親和性を有し、治療用抗体や診断薬用途での産業应用到に結びつく重要な特徴と考えられる。

### DNA免疫法の問題点

一方、DNA免疫法で抗体ができなかったプロジェクトは下記のいずれかに当てはまっていた。ここでは問題点として記述する。

- 一過性発現哺乳動物細胞における発現レベルが低い標的分子の場合
  - 細胞内に局在する標的分子の場合、細胞表面に発現させることができないことがある
  - 細胞外領域が小さすぎる場合は免疫システムが反応しない。
- などがあげられる。

発現量の改善はバクテリアの改変や免疫方法を最適化することで改善されるケースもあり、今後の改良の余地がある。

標的分子の細胞での局在性を変える場合は分泌シグナルの付加や特定の器官へのロケーションシグナルを除去することで解決されることがあるが、特にロケーションシグナルに関する情報は不明な点も多く、実際実施してみないと結果が出ないことが多い。

細胞外領域の問題は、特に複数回膜貫通タンパク質の場合に多く散見されるが、ネイティブフォームの抗原を認識する抗体作製を目的としている以上、基本的に標的分子全長を用いることになるため、細胞外領域が40アミノ酸以下の場合はその領域がエピトープとなる抗体作製は困難であることが多い。

抗体を作製する手法は数多くあるが、標的分子や目的によってはDNA免疫法が最も目的に応じた抗体を得られる技術であると考えている。

DNA免疫法はさまざまな新規技術を導入することができることから、今後は、適切な哺乳動物細胞の調製などの技術改良を、成功率の向上に結びつけると共に医薬品用途などの産業利用される抗体の開発を行いたい。

### 文 献

- 1) Tang, D. *et al.*: *Nature*, **356**, 152 (1992).
- 2) Bowne, W. B. *et al.*: *Cytokines Cell Mol. Ther.*, **5**, 217 (1999).
- 3) Encke, J. *et al.*: *World J. Gastroenterol.*, **12**, 7118 (2006).
- 4) Elagöz, A. *et al.*: *Br. J. Pharmacol.*, **141**, 37 (2004).
- 5) Krause, S. *et al.*: *Mol. Immunol.*, **43**, 1799 (2006).