

ニワトリ抗体の医薬品への応用展開

(株式会社ファーマフーズ) 庄屋 雄二・豊浦 雅義*

近年、治療困難であった疾患（ガンやリウマチなど）に対して優れた薬効を示す抗体医薬が多数上市され、抗体医薬の市場は急速に拡大してきている。そのような背景から多くの研究機関が新規な抗体医薬の開発を行っているが、抗体のできにくい分子に対する抗体の作製が課題となっている。特に、マウスなどのげっ歯類を用いて抗体を作製した場合、哺乳類間で相同性の高い分子に対する抗体の取得はきわめて困難である。一方、我々の技術であるニワトリモノクローナル抗体作製技術は、免疫動物に種間が離れたニワトリを用いていることで、免疫寛容の問題を回避することができる。加えて、免疫を行うことで、抗体の親和性成熟がおきることから親和性の高い抗体を取得することができる。したがって、免疫動物にニワトリを用いることで、マウスなどでは取得が困難であったターゲット分子に対して、さまざまなエピトープに対する抗体を作製することができ、さらには親和性が高い抗体を得ることができる。また、我々は抗体遺伝子の改変によってキメラ抗体やヒト化抗体を作製する技術を有しており、ニワトリ・マウスキメラ抗体などは動物実験に、ニワトリヒト化抗体は治療用の抗体医薬として応用が可能であり、これまで開発が困難であった抗体ができにくいターゲット分子に対して、新たな抗体医薬の事業化を展開している。

本稿では、実用化が可能となったニワトリ抗体を用いた抗体医薬品への展開を概説する。

抗体作製におけるキーポイント

ニワトリのモノクローナル抗体作製技術は、細胞融合法、DT40細胞活用法などがあるが、我々はファージディスプレイ法で行っている。本法により、哺乳類タンパク質に対して網羅的に効率良く親和性の高い抗体を取得することができる^{1,2)}。そこで、まずはモノクローナル抗体の作製における二つのキーポイントを述べる。一つは、ターゲット分子に対して網羅的に抗体取得が行えるかどうかである。網羅的に抗体取得を行うことで、アンタゴニスト抗体やアゴニスト抗体などの機能性を有する抗体

取得の可能性が広がる。もう一つは、親和性の強い抗体が取得できるかどうかである。親和性が強い抗体でなければ、感度の良い診断薬や、薬効の強い治療薬につながらないため、 K_D 値 10^{-9} M以上の強い親和性を有する抗体の取得が望まれる。

網羅的に抗体作製を行いたい場合、ターゲット分子が免疫原性を有するかどうかを確認する必要がある。たとえば、ヒトタンパク質がターゲットとなる場合、マウス相同分子とニワトリ相同分子の相同性をアミノ酸レベルで比較することで、どの部分がエピトープになりうるか、エピトープの数にどのような差があるのか容易に推測することができる。多くのヒトタンパク質にとって、ニワトリは種間が離れていることから非常に優れた免疫動物になりうる。

もう一つのキーポイントである親和性の点であるが、抗体取得のためのソース（たとえば脾臓細胞）が親和性成熟を経ているかどうかを考慮する必要がある。哺乳類および鳥類は、抗原による感作を続けると抗体可変領域遺伝子にポイントミューテーションが起こり、親和性の強い抗体が選択されてくる仕組みがある。この仕組みは親和性成熟（アフィニティマチュレーション）と呼ばれているが、親和性成熟を経たソースを元にしていないかどうかで、親和性の強い抗体の取得効率が大きく異なってくる。我々自身の経験として、ソースに免疫を行っていないニワトリ由来のファージライブラリー（ナイーブライブラリー）と免疫を経たファージライブラリー（免疫ライブラリー）の二つを用いて抗体取得を試みたことがあるが、比較すると1桁から2桁親和性の強い抗体が免疫ライブラリーから得られてくる。

ファージディスプレイ法によるニワトリモノクローナル抗体の作製

ファージディスプレイ法によるニワトリモノクローナル抗体を作製する具体的な方法は以下のとおりである。ニワトリに抗原を免疫し、抗体価の上昇した個体から脾臓細胞を回収する。回収した脾臓細胞からRNAを抽出

* 著者連絡先 E-mail: toyoura@pharmafoods.co.jp <http://www.pharmafoods.co.jp/>



し、抗体の変領域遺伝子 (V_H および V_L) をPCRによって増幅する。増幅した抗体変領域遺伝子をリンカーでつなぎ、ファージミドベクターに組み込み、ヘルパーファージを感染させることでファージライブラリーを製作する。ファージライブラリーを基に、パニング操作による特異抗体の濃縮とクローニングによってファージ発現の単鎖型抗体 (scFv抗体) を得ることができる(図1)。

ニワトリ組換え抗体作製技術

scFv抗体遺伝子を基に、使用目的に応じて種々の改変抗体を構築可能である(図2)^{2,3}。ニワトリ型抗体(IgY型、IgY-F(ab')₂型など)は、特に免疫組織化学染色において標識抗体由来の非特異反応が少ないことから、検査薬や診断薬の良い材料となりうる。ニワトリ/マウス

キメラ型抗体 (mIgG1, mIgG2aなど) は、マウスへ投与することが可能であり、各種疾患モデルを用いた動物試験に応用でき、ニワトリ/ヒトキメラ型抗体 (hIgG1, hIgG4) は、ADCC活性(抗体依存性細胞傷害活性)などの各種*in vitro*試験に活用することができる。これら試験を行うことで、抗体の持つ機能性を評価することができ、抗体医薬としての応用につなげていくことができる。抗体医薬に応用するためには、CDR(complementarity determining region)-graftingという手法によって、ニワトリ抗体のヒト化を行い⁴⁾、臨床開発を進めていく。現在、これら組換え改変体はCHO細胞やHEK293細胞などで容易に生産可能であり、すでにこれら改変抗体は*in vivo*や*ex vivo*で評価試験が進行中である⁵⁾。

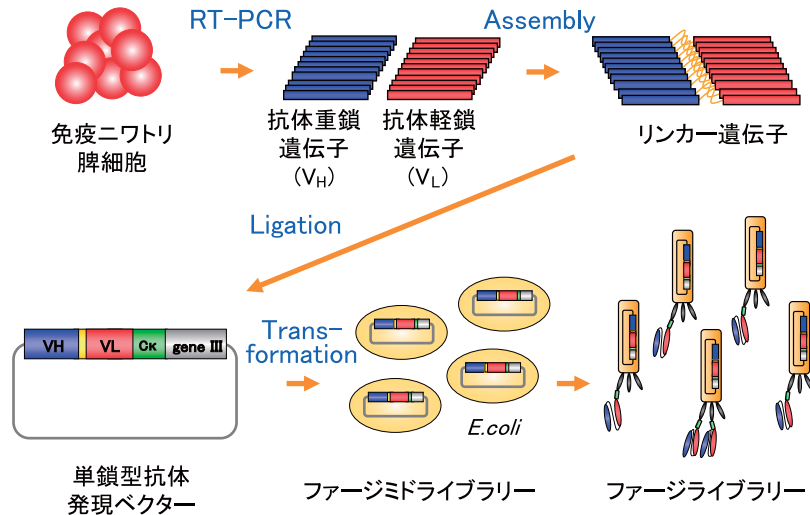


図1. ファージディスプレイ法

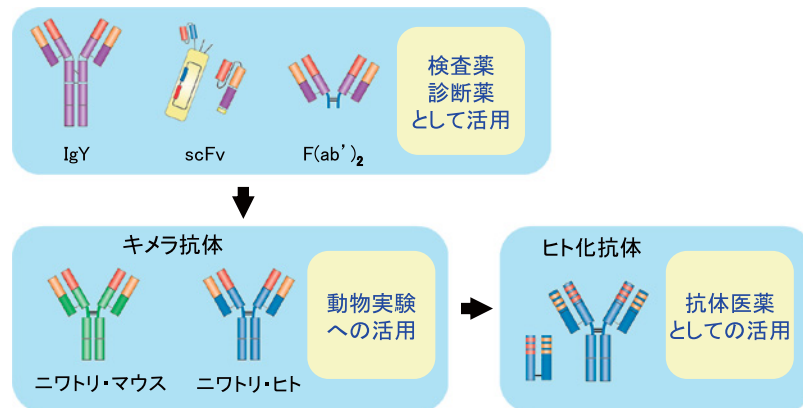


図2. ニワトリ抗体の改変



膜タンパク質に対する抗体作製

膜タンパク質に対してモノクローナル抗体の作製が困難なケースがあるが、その理由の一つとして、免疫原となる抗原の立体構造がネイティブな構造を持っていないことがある。たとえば、細胞外領域のペプチドやリコンビナントタンパク質を免疫原に用いた場合、ネイティブな目的分子には反応せず、免疫原に用いた分子にのみ反応する抗体が得られることがしばしばある。特に、膜タンパク質に対して機能性を持つ抗体（アゴニスト抗体やアンタゴニスト抗体）を得たい場合、この問題が大きな障害となることがあるが、この課題の解決方法として、細胞に膜タンパク質を発現させ、目的分子発現細胞そのものを免疫原に用いることで、ネイティブな目的分子に反応する抗体を得ることができる。ここで目的分子を発現させる細胞株に注意が必要である。リコンビナント産生用の哺乳類細胞（たとえば、CHO細胞やHEK293細胞）に膜タンパク質を発現させ、本細胞をニワトリに免疫した場合、目的分子以外の多くの表面分子に対して抗体が作られてしまう。そこで、我々のアプローチはニワトリ細胞に膜タンパク質を発現させ、本細胞を免疫原に用いる方法である（図3）。免疫原にニワトリ細胞を用いることで、目的分子以外の抗体ができるのを極力抑えることができる。

本方法を用いた実施例として、広島大学松田治男らの研究グループが世界で初めてインテグリン $\alpha 8\beta 1$ の機能阻害能を有する抗体の取得に成功している⁶⁾。インテグリン $\alpha 8\beta 1$ は哺乳類間で相同性が高いため（ヒト-マウス間：90%）、免疫動物にマウスを用いた場合、免疫原性が低く有用な抗体を得ることができにくいターゲットといえる。一方、ヒトとニワトリの相同性は低く（ヒト-ニワトリ間：77%）、免疫動物にニワトリを用いることで機能阻害能を有する抗体の取得に成功したものと思われる。加えて有益な知見として、得られた抗体はヒトインテグリン $\alpha 8$ に反応するのみならず、マウスインテグリン $\alpha 8$ にも反応する抗体である。マウスインテグリン $\alpha 8$ にも反応することから、さまざまな種類の疾患モデルマウスに本抗体を供試することができ、新たな疾患の治療薬に結びつく研究が加速することが期待される。

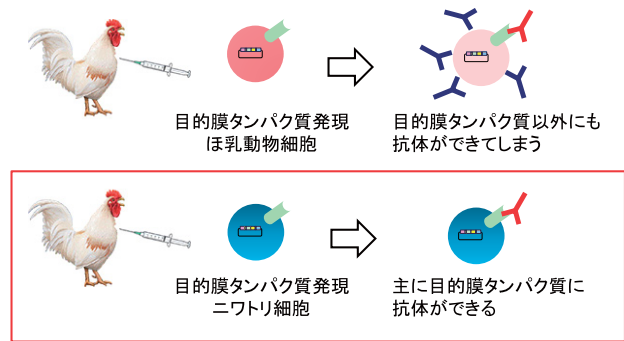


図3. 免疫用細胞の違い

おわりに

ニワトリを用いたバイオ技術として開発された「ニワトリモノクローナル抗体作製技術」は、ヒトのエピトープに対して特異性および親和性が高い抗体を得ることができ、特に哺乳類間で保存性が高いタンパク質や膜タンパク質に対する抗体作製は、マウスやラットに比べて明らかな優位性を有する。我々は、さらにニワトリ抗体のキメラ抗体やヒト化抗体作製技術も有し、これまでの抗体作製とは異なる新たなアプローチで抗体医薬の開発を進めている。

謝 辞

本ニワトリモノクローナル抗体作製技術は、広島大学大学院 生物圏科学研究科 免疫生物学研究室の松田治男らのグループによって基盤構築された技術です。抗体医薬開発において、既存の方法では創出することができない有用な抗体を作出することができる基盤技術を構築し、我々に技術移管を行って頂いたことに対して心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Nakamura, N. *et al.*: *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 807 (2004).
- 2) Miyamoto, K. *et al.*: *Biologicals*, **35**, 31(2007).
- 3) Nishibori, N. *et al.*: *Biologicals*, **32**, 218 (2004).
- 4) Nishibori, N. *et al.*: *Mol. Immunol.*, **43**, 634 (2006).
- 5) Shimamoto, T. *et al.*: *Biologicals*, **33**, 169 (2005).
- 6) 松田治男ら：WO2011/049082 A1