

ファージディスプレイによる診断治療に有用なヒト型抗体医薬の開発

伊藤 邦彦

Development of Diagnostically and Therapeutically Useful Human Antibody Medicines by Phage Display System

Kunihiko ITOH

Department of Clinical Pharmacology and Genetics, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka City 422-8526, Japan

(Received September 5, 2006)

Phage display has been utilized for making recombinant antibody fragments (Fab or single chain Fv) of human, mouse, or other origins. After construction of an antibody combinatorial library, antigen-specific recombinant antibody fragments can be easily isolated by biopanning of the phage library displaying antibody fragment fused with viral coat protein III against antigen proteins, antigen-expressing live cells, or fixed cells. Using this technique, a variety of human recombinant antibody fragments can be retrieved from bone marrow cells, lymph node cells, or peripheral blood cells of patients with infectious diseases, autoimmune diseases, and cancer. To develop diagnostically and therapeutically useful human antibody medicines, we should first select recombinant antibody fragments not only with antigen-binding activity but also with bioactivity such as virus or toxin neutralization, or tumor-specific cytotoxicity. To achieve this goal, several steps in antibody phage display may be improved: 1) a larger library should be constructed for possible isolation of minor populations present in the repertoire; 2) the biopanning procedure should be improved for isolation of antibody fragments reactive with immunologically minor epitopes; 3) the screening procedure should be based on the measurement of the bioactivity as well as the antigen-binding activity; 4) if necessary, the affinity and specificity of selected antibody fragments should be improved. In this review, I discuss how to isolate clinically useful recombinant antibody fragments efficiently using a phage display system introducing our achievements.

Key words—phage display; human antibody medicine; diagnosis; therapy

1. はじめに

臨床応用可能な抗体とはどのような特徴を有しているのだろうか。まず、診断（体外診断をいう）に有用な抗体は、1) 疾患特異的抗原を認識している、2) 抗原に対して高親和性である、3) 正常組織などの非特異的結合がないという性質を有する必要がある。さらに、治療に有用な抗体は、先に挙げた特徴に加えて、4) 生物活性（ウイルスや細菌毒素の中和活性あるいは抗腫瘍効果など）を有すること、5) 人体への投与に伴う副作用が少ないかあるいは効果が副作用を上回ることが必要条件となる。現在臨床では、HER2 過剰発現が確認された転移性乳癌

の治療に用いられているトランスツズマブ（ハーセプチン）や CD20 陽性の B 細胞性非ホジキンリンパ腫の治療に用いられているリツキシマブ（リツキサン）を始めとして、多くの抗体医薬が癌、ウイルス感染症、自己免疫疾患の治療に用いられ、高い治療成績を上げている。しかし、これらの抗体医薬の多くはヒト化モノクローナル抗体であり、マウス抗体としての抗原性が残存していることに伴う治療効果の減弱やアナフィラキシーショック等が懸念される。一方、完全ヒト型抗体を用いることによりこのような問題点が克服可能になる。完全ヒト型抗体による抗体医薬は現在その多くが臨床試験段階であり、臨床の場で使われているものは多くはない。完全ヒト型抗体の作製法は各種報告されているが、本総説では、ファージディスプレイ法^{1,2)}に焦点を当て、高親和性で生物活性を有し診断や治療に応用可能な完全ヒト型抗体を、効率よく作製するために必

静岡県立大学薬学部臨床薬効解析学分野 (〒422-8526 静岡市駿河区谷田 52-1)

e-mail: itohk@u-shizuoka-ken.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 126 年会シンポジウム S23 で発表したものを中心に記述したものである。



Fig. 1. The Electron Micrograph of Negatively Stained f1 Bacteriophage Particle
This figure is adapted from Ref. 3).

要な工夫等についてわれわれの研究成果を紹介しながら論じていきたいと思う。

2. 抗体ファージディスプレイ

2-1. フィラメンタスファージ ファージディスプレイに用いるベクターは、フィラメンタスファージ由来である。フィラメンタスファージは、幅 7 nm、長さ 900—2000 nm という細長い円柱状をしている (Fig. 1).³⁾ フィラメンタスファージの中でも F 接合プラスミドを持つ大腸菌に感染する M13, f1, fd ファージがよく研究されている。ファージ表面は数種のコートタンパク質 (cp; coat protein 1—9) に覆われているが、ファージディスプレイ法は、それら cp と標的遺伝子産物を融合タンパク質としてファージ表面に発現させようとするものである。中でも、遺伝子 III 由来のマイナーカプシドプロテイン (cp3) や遺伝子 VIII 由来のメジャーカプシドプロテイン (cp8) が主に用いられている。

2-2. ファージディスプレイヒト型抗体ライブラリーの構築 ヒト型抗体作製の出発材料として、患者あるいは健康人から採取した骨髄細胞、リンパ節、あるいは末梢血リンパ球などが用いられる。中でも抗体産生細胞である B 細胞に富む骨髄細胞が好んで用いられるが、常に採取できるとは限らないという欠点もある。これらの試料よりトータル RNA を抽出し、オリゴ (dT)₁₅ をプライマーとして cDNA を合成する。次に抗体 H 鎖 Fd 部分及び L 鎖部分に特異的なプライマーを用いた PCR により抗体遺伝子断片を増幅する。これらの遺伝子断片を M13 由来ファージベクター (ファージミド) に挿入することにより抗体 Fab に対応する遺伝子ライブラリーを構築する (Fig. 2).⁴⁾ また、H 鎖及び L 鎖の可変部分を PCR で増幅し、これらをリンカーでつないでベクターに挿入して一本鎖 Fv 遺伝子ライブラリーを構築する方法もある。

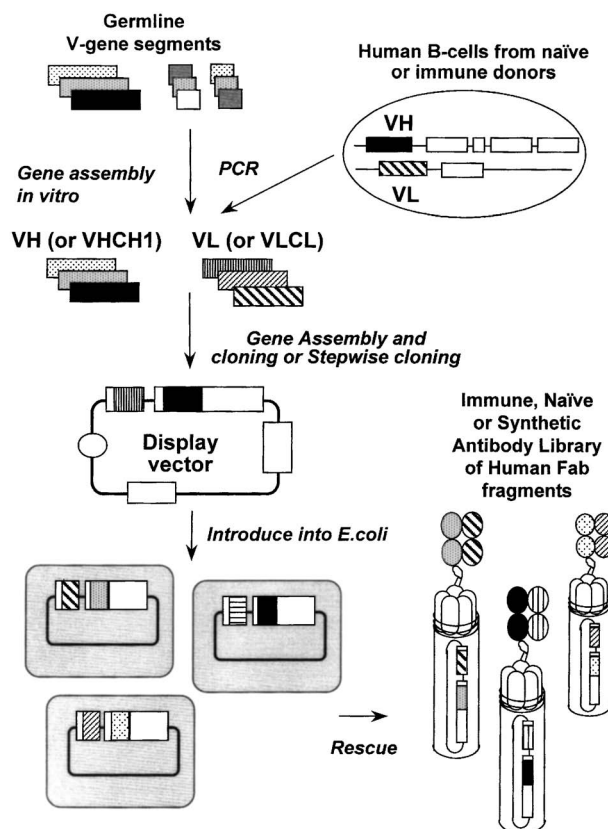


Fig. 2. Construction of a Human Ab Library Displayed on Phage

This figure is adapted from Ref. 4).

抗体ライブラリーの種類はいくつかあるが、最も一般的には、免疫ドナーあるいは免疫動物由来の抗体ライブラリーが挙げられる。本ライブラリーで



伊藤邦彦

静岡県立大学薬学部教授。1960年宮城県生まれ。東北大学薬学部卒業。同大学院薬学研究科博士課程修了。日本学術振興会特別研究員、東北大学医学部附属病院助手、秋田大学医学部助教授を経て2005年4月より現職。この間、米国スクリプス研究所留学。1991年日本薬学会東北支部奨励賞。ゲノム情報に基づく創薬としてのヒト型リコンビナント抗体医薬の開発と臨床応用に関する研究に従事。

は、抗体レパートリー中に抗原特異的抗体群が濃縮されており高親和性抗体の単離が容易である。次に、シングルポットレパートリーが挙げられる。これには、非免疫ドナー由来抗体ライブラリー（ナイーブレパートリー）と合成抗体ライブラリーがある。前者は抗原感作されていないヒトの B 細胞 IgM mRNA よりレパートリーを作製しようとするものであり、ライブラリーの大きさや多様性が十分であれば、自己抗原や免疫原性のない抗原など多くの抗原パネルに対応可能な抗体を作製可能である。後者は抗体の V セグメントと D/J セグメントを試験管内でアセンブルさせることにより、人工的に抗体ライブラリーを構築するものである。CDR3 部分のランダム化により多様性を持たせることが可能になる。また、親抗体の V 遺伝子に多様性を導入することにより 2 次ライブラリーを構築する試験管内親和性熟成という方法があり、抗原結合のアフィニティやキネティクスに基づきスクリーニングすることによって、親抗体よりも高親和性のバリエーション抗体を単離することが可能になる。

2-3. パニングによる抗体ライブラリーの濃縮
ファージミドベクターを用いて構築した抗体遺伝子ライブラリーを大腸菌に導入し、ヘルパーファージ (VCSM13 など) を感染させることにより、抗体提示ファージライブラリーを作製する。抗体の認識す

る抗原があらかじめ分かっている場合、精製抗原を用いて固相法によりファージライブラリーから目的とする抗体を提示するファージ集団を濃縮することが可能である。本法はパニング法と呼ばれ、抗原とファージライブラリーの反応、洗浄、抗原結合ファージの溶出、大腸菌への感染による増幅というステップを 4—5 回繰り返すことにより、抗原特異的ファージを 100—1000 倍に濃縮することができる (Fig. 3).⁵⁾ パニング法はファージディスプレイ法の大きな利点の 1 つである。従来のラムダファージクローニングシステムでは、目的クローンを得るために数千—数万クローンのスクリーニングが必要であったが、ファージディスプレイ法では数十—数百クローンのスクリーニングをするだけで目的クローンを得ることが可能である。抗原特異的ファージリガンドの選択法として、先に挙げた精製抗原と反応させ、酸あるいはアルカリで溶出させる方法のほか、抗原特異的な抗体を用いて溶出させる方法、液相中でビオチン化抗原と反応させる方法、アフィニティカラムを用いる方法、生細胞と反応させる方法、組織切片と反応させる方法、ウェスタンブロットした膜上の抗原と反応させる方法、インビボ選択法 (マウスにライブラリーを尾静注し、特定臓器に集積したファージを回収する方法) など様々な方法がある (Fig. 4).⁴⁾ 抗原の性質や性状、さらには精製タンパ

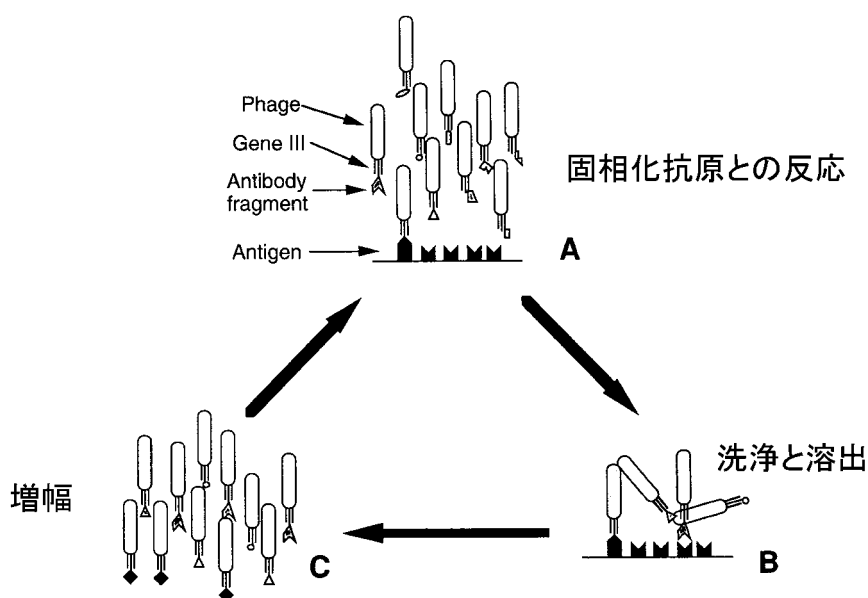


Fig. 3. Schematic Diagram of the Panning Process
This figure is adapted from Ref. 5).

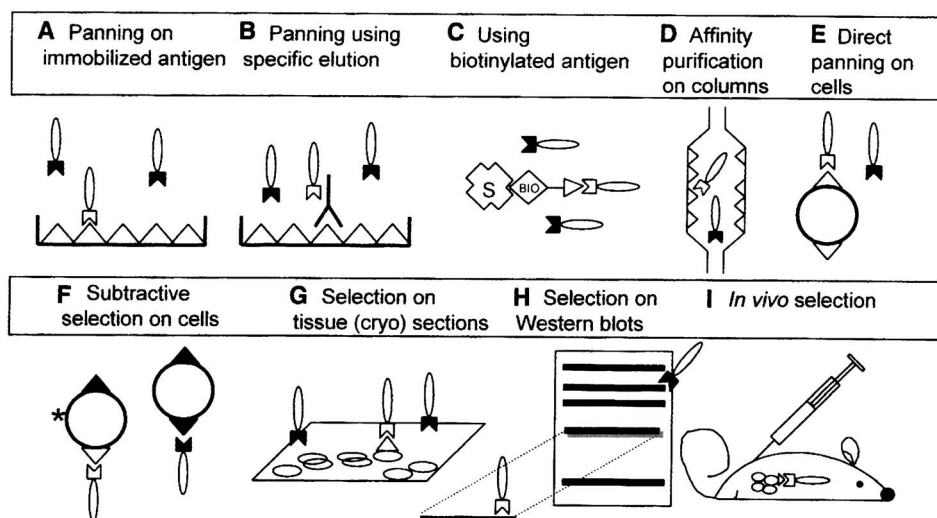


Fig. 4. Selection Strategies for Obtaining Specific Phage Ligands
This figure is adapted from Ref. 4).

ク質やリコンビナントタンパク質として入手可能かどうかなどで、パニング法を決めていく必要がある。パニングの成否の確認は、各ラウンドで溶出してきたファージのタイターをモニターすることにより行う。すなわち、パニングによりファージ集団が濃縮されればタイターはラウンドを追う毎に上昇するが、濃縮されなければ上昇はみられないかごくわずかである。しかしながら、われわれの経験であるが、ファージタイターの上昇がみられない場合でも、抗原特異的リコンビナント Fab の単離に成功する場合もある。

2-4. 抗原特異的ファージクローンの選択 パニングによって濃縮されたファージ集団から目的とするリコンビナント Fab をスクリーニングする場合、抗体提示ファージのままスクリーニングを行うかあるいはリコンビナント Fab にしてからスクリーニングを行うかいずれかの方法を用いる。抗原結合活性を指標にスクリーニングを行う場合、ELISA プレートにコートした精製抗原との反応性を調べる方法や生細胞あるいはパラフォルムアルデヒドなど固定した細胞との反応性を調べる方法などがある。さらには、表面プラスモン共鳴法に基づき抗原親和性や抗原との結合や解離のキネティクスを指標として調べる方法もある (Fig. 5).⁴⁾ このとき、ヒト血清アルブミンその他の生体由来タンパク質あるいは外来タンパク質との非特異的な反応のないことを確認しておくことが大切である。また、受

容体への結合活性と引き続く細胞機能の調節活性 (受容体への結合とシグナル伝達) に基づく、いわゆる機能性スクリーニング法を用いれば、生物活性を有するリコンビナント Fab をダイレクトに単離することが可能になるものと考えられる。生物活性を指標としたスクリーニング法として、ほかには、受容体のインターナリゼーションの誘導、アポトーシスの誘導、トランスポータの機能阻害、受容体の架橋によるシグナル伝達誘導、膜貫通型受容体の刺激によるシグナル伝達誘導などを指標とした方法がある (Fig. 6).⁴⁾ 獲得したい抗体機能に応じてスクリーニング法を選択する。対応抗原に対して高特異性及び高親和性である上に生物活性が付与されれば、臨床応用という観点から非常に有望な抗体医薬の誕生につながるものと期待される。

2-5. リコンビナントタンパク質の発現 通常は大腸菌による発現系を用いてリコンビナント Fab あるいは scFv を調製する。これらの抗体断片は抗原結合部位が 1 価であり抗原結合は起こってもそれに引き続く生物活性発現のトリガーを引くことが難しい (例えば受容体には結合するが架橋できないためシグナル刺激ができないなど) 場合が多い。また、抗腫瘍活性を持つ抗体の場合、生体の免疫系を利用した補体依存性細胞障害活性 (CDC) や抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) を利用するためには、抗体 Fc 部分がどうしても必要となる。以上のような理由から、リコンビナント Fab として抗体遺伝

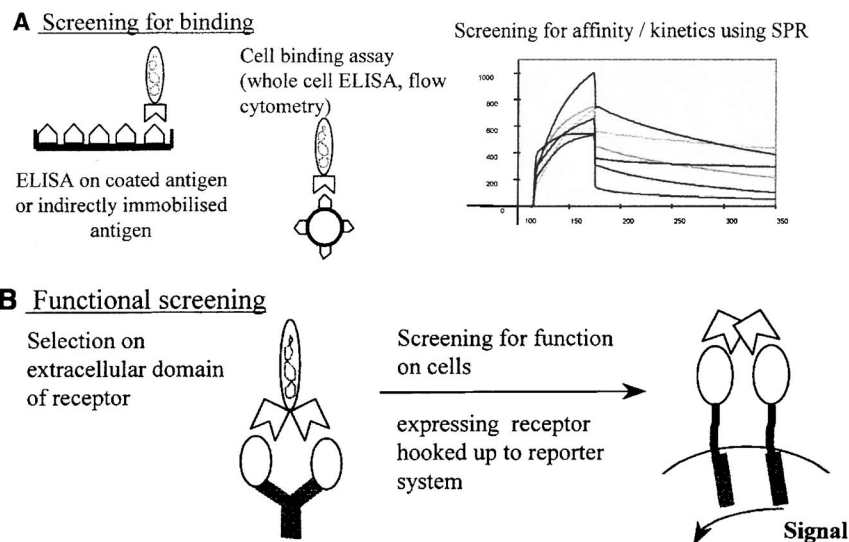


Fig. 5. Multiple Strategies for Screening Phage Ligands
This figure is adapted from Ref. 4).

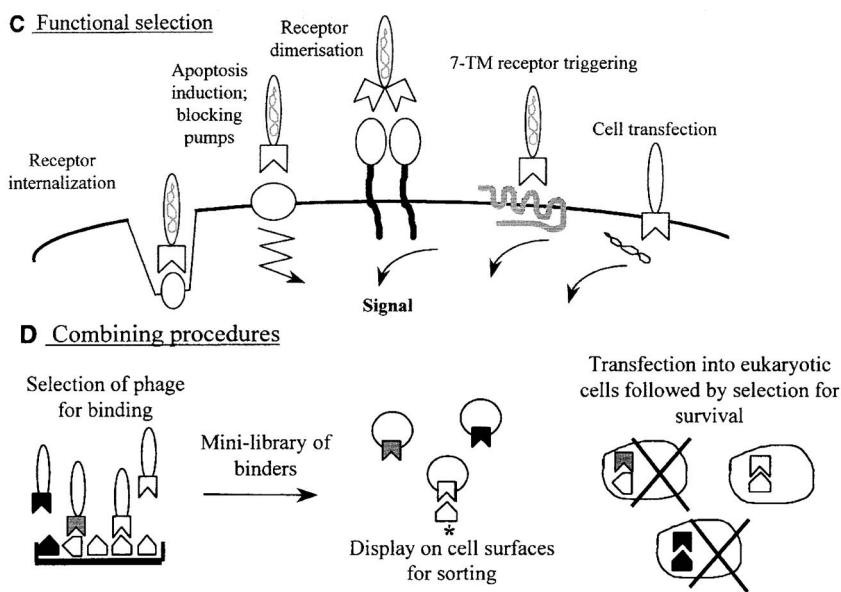


Fig. 6. Multiple Strategies for Selecting Phage Ligands
This figure is adapted from Ref. 4).

子を単離したあとに完全 IgG への再構築が行われている。Sanna らは、ファージベクターに組み込んだ Fd (VH+CH1) 及び VL+CL と同じクローニングサイト持ち、さらに、Fd の下流には Hinge+CH2+CH3 ドメインを配置した pFab-CMV を作製し、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) に完全 IgG を発現させる系を構築した (Fig. 7).⁶⁾ この系は、単離したリコンビナント Fab を出発材料としてリコンビナント完全 IgG を容易に作製でき

るという利点を有している。ところで、設楽らのグループは、抗体 Fc 部分の Asn (297) 結合オリゴ糖のフコースを除去すると抗体の ADCC 機能が增强することを見出した。⁷⁾ 彼らは、フコース基転移酵素活性を欠損した細胞株を作製し、これに抗体遺伝子を導入してフコース欠損リコンビナント抗体の作製を行っている。⁸⁾ 試験管内や培養細胞あるいは小動物を用いた検討には、少量の精製抗体があれば、十分対応可能であるが、臨床応用においては、

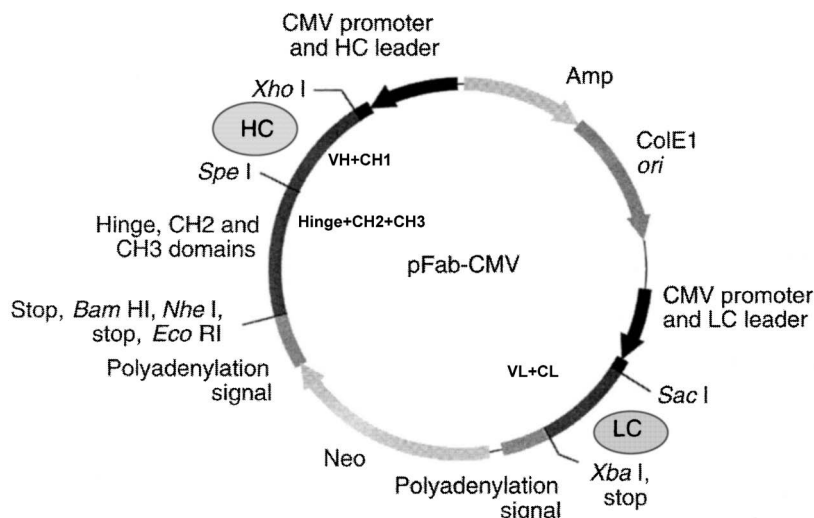


Fig. 7. Map of the Expression Vector pFab-CMV Showing Functional Regions and Unique Restriction Sites for Cloning of HC and LC and Excision of Ig γ 1 Constant-region Sequences
This figure is adapted from Ref. 6).

高純度の抗体が大量に必要であり、特に生体内の免疫系を利用した生物活性（CDC や ADCC など）の発現を期待する場合には、完全 IgG の安定供給体制の確立が必要になるものと考えられる。

3. ロタウイルスに対するヒト型リコンビナント Fab の単離

本章では、ロタウイルス感染症治療薬の開発を目的として、ロタウイルス抗体価の高値であった健康人の末梢血リンパ球を出発材料として、抗ロタウイルスリコンビナント Fab を単離し性状解析を行ったわれわれの研究成果⁹⁾を紹介する。

3-1. ロタウイルス ロタウイルスは、レオウイルス科に属する RNA ウイルスであり、内殻及び外殻の 2 重殻構造を持っている (Fig. 8).¹⁰⁾ ロタウイルスは、経口的に摂取され、小腸に達すると、絨毛突起先端部の上皮細胞で増殖し、これらの細胞の脱落を引き起こす。この結果、小腸の吸収能力が障害され、下痢を引き起こす。発展途上国においては、今なおロタウイルス下痢症が小児の死亡原因の上位に位置しており、ロタウイルス感染症治療薬の早期開発が待ち望まれている。ところで、ロタウイルスの構成タンパク質のうちで、免疫学的に重要なものとしては、ウイルス活性の中和に関係する外殻タンパク質 VP4 及び VP7、ウイルス構成タンパク質の約 50% を占める内殻タンパク質 VP6 が挙げられる。VP6 はウイルス活性の中和には関連しない

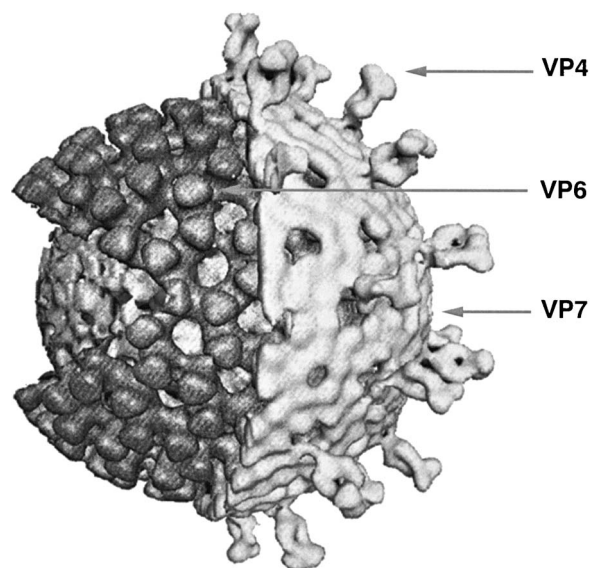


Fig. 8. Three-dimensional Structure of Rotavirus Particle
This figure is adapted from Ref. 10).

が、生体試料からのロタウイルスの検出や同定に広く用いられている抗原である。

3-2. 健康人末梢血リンパ球からの抗体ライブラリーの構築 健康人ボランティア 11 名の血清中ロタウイルス抗体価をサンドイッチ ELISA 法により測定した結果、3 名で高値を示した。うち 2 名より末梢血リンパ球を採取し、RT-PCR により増幅した抗体遺伝子断片をファージディスプレイベクター *pComb3* に挿入することにより、IgG₁, κ 抗体

遺伝子ライブラリーを構築した。2つのライブラリー N 及び O のサイズは、それぞれ 2.5×10^7 及び 4.0×10^6 cfu であった。

3-3. 抗ロタウイルスリコンビナント Fab の選択
得られた抗体遺伝子ライブラリーを大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることにより、抗体提示ファージライブラリーとした。ロタウイルス特異的 Fab を発現するファージ集団は、ウサギ抗血清でキャプチャーしたヒトロタウイルス Wa 株 (HRVWa) に対する 5 ラウンドのパニングにより濃縮した。このいわゆる抗体キャプチャーパニング法¹¹⁾によりファージタイターは約 30 倍に上昇した。最終ラウンドのパニングより得られたファージミドを可溶性 Fab 発現型に変換後大腸菌に導入した。これをカーベニシリンプレートにプレーティングして得られたシングルクローンから調製したリコンビナント Fab (各ライブラリーから 100 クローン) の HRVWa に対する反応性をサンドイッチ ELISA 法により検討した。その結果、それぞれ N ライブラリーから 21 個、O ライブラリーから 10 個の陽性クローンを得た。陽性クローンの相同性について *Bst*NI フィンガープリンティングにより検討し、最終的に、N ライブラリーから 5 個、O ライブラリーから 3 個のリコンビナント Fab クローンを単離することに成功した。

3-4. 抗ロタウイルスリコンビナント Fab の反応特異性
選択した 8 個のリコンビナント Fab クローンについて、HRVWa に対する反応性を検討した結果、すべてのクローンが濃度依存的に HRV-

Wa と反応することが明らかとなった (Fig. 9)。また、これらの Fab クローンが自己あるいは非自己由来の各種抗原と交差反応しないことを確認した。次に、リコンビナント Fab クローンの認識する抗原を推定する目的で、HRVWa 以外のロタウイルス株との交差反応性について検討した。検討に用いた株は、HRVWa のほかに AU-1, AU64, 及びサルロタウイルス (RRV) であり、それらの G (VP7) 血清型, P (VP4) 血清型及びサブグループ (VP6) は、HRVWa : 1, 1A [8], II ; AU-1 : 3, 3 [9], I ; AU64 : 1, 1B [4], I ; RRV : 3, 5 [3], I である。その結果、N ライブラリークローンは、すべての株に対してほぼ同等の反応性を示した。一方、O ライブラリークローンは、HRVWa に対して優位に反応することが明らかとなった (Fig. 10)。

3-5. 抗ロタウイルスリコンビナント Fab の可変部構造解析
得られた 8 クローンの H 鎖及び L 鎖可変部の塩基配列解析を行った。その結果、N ライブラリークローンは、VH4 ファミリーに属し、DP-65 ジャームライン由来であることが明らかとなった。すべてのクローンは同一の D 及び J セグメントを用いていた。それに対して、O ライブラリークローンは、VH3 ファミリーに属し、V3-21 ジャームライン由来であることが明らかとなった。これらのクローンもまた、同一の D 及び J セグメントを用いていることが明らかになった。一方、L 鎖遺伝子では、多様性が認められた。すなわち、同一ライブラリー内のクローン間でも、属する VL フ

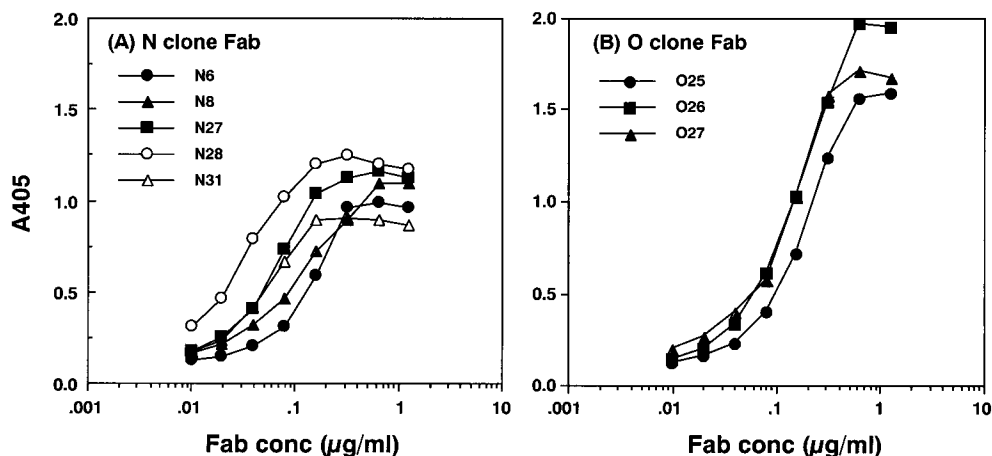


Fig. 9. Reactivity of Anti-human Rotavirus Recombinant Fab Clones against HRVWa

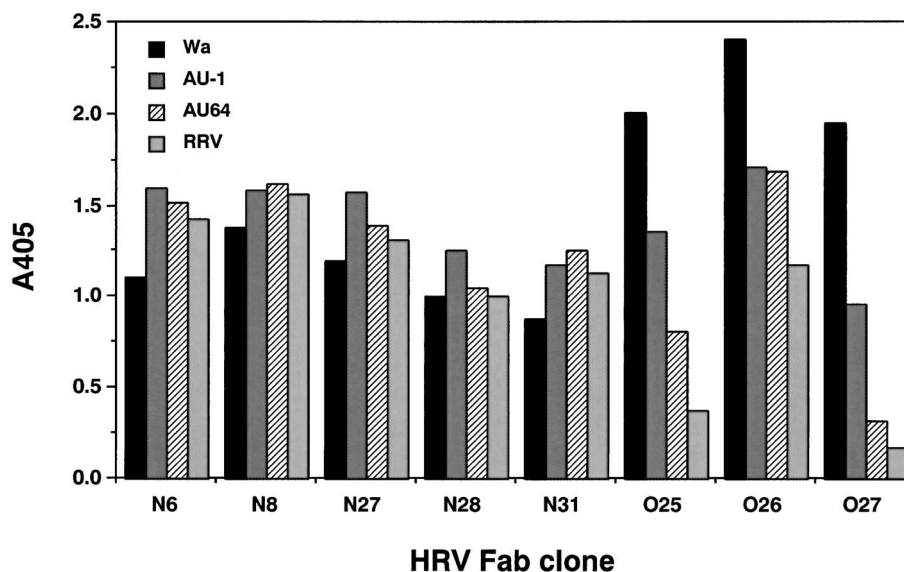


Fig. 10. Rotavirus Strain-cross Reactivity of Anti-human Rotavirus Recombinant Fab Clones

Table 1. Comparison on Gene Usage and Structural Homologies for Heavy- and Light-chain Variable Regions of Anti-human Rotavirus Recombinant Fab Clones

Fab	VH gene usage					VL gene usage				
	VH family	Nearest VH	% Homology with germline		JH	VL family	Nearest VL	% Homology with germline		JL
			VH DNA	VH protein				VL DNA	VL protein	
N6	4	DP-65	86.8	78.1	JH4b	kI	DPK9	97.2	94.7	Jk5
N8	4	DP-65	86.5	76.0	JH4b	kII	DPK15	96.0	92.0	Jk2
N27	4	DP-65	86.8	76.0	JH4b	kIII	DPK22	96.5	95.8	Jk2
N28	4	DP-65	86.5	76.0	JH4b	kIII	DPK22	96.5	96.9	Jk1
N31	4	DP-65	86.5	76.0	JH4b	kI	DPK9	96.5	93.7	Jk4
O25	3	V3-21	91.2	86.3	JH4b	kI	L12a	95.8	92.6	Jk2
O26	3	V3-21	91.2	86.3	JH4b	kIII	DPK22	96.9	94.8	Jk1
O27	3	V3-21	91.2	86.3	JH4b	kI	DPK9	95.8	91.6	Jk2

ファミリーや由来するジャームラインがそれぞれ異なっており、また、ライブラリーを超えて、属するVLファミリー及び由来するジャームラインが一致するクローンも認められた (Table 1)。以上の結果より、同一ライブラリー内のクローンは、単一のVH遺伝子と多彩なVL遺伝子の組み合わせによって成り立っており、先に示した2つのライブラリークローン間での各種ロタウイルス株に対する反応性の違いは、H鎖構造の違いに起因すること、換言すれば、H鎖構造がクローンの抗原特異性を規定している可能性が示唆された。

3-6. 抗ロタウイルスリコンビナント Fab の認識

する抗原の解析 リコンビナント Fab クローンの認識する抗原をウエスタンブロット法により解析した。HRVWa を還元条件下 SDS-PAGE により分離後、ニトロセルロース膜に転写し、これに N28 及び O27 クローンを反応させた。HRP-ABC 法により抗原抗体複合体を検出し、DAB-Ni により発色させた。その結果、HRVWa に対するウサギ抗血清によって最も強く染色された約 44 kDa のバンド (VP6 タンパク質) とほぼ同一のバンドのみが染色された。以上の結果より、いずれのライブラリー由来のリコンビナント Fab クローンも、ロタウイルスの VP6 タンパク質を認識していることが

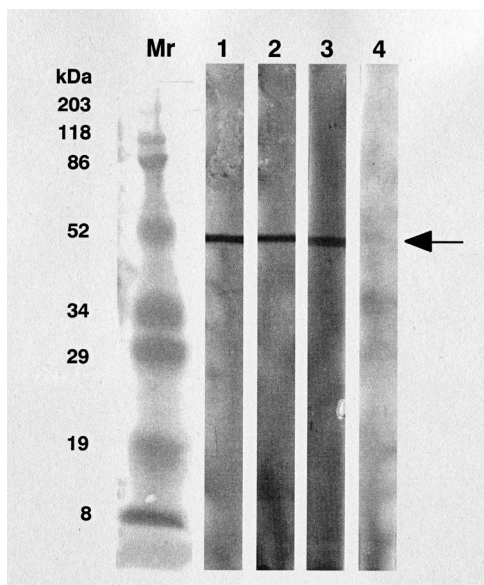


Fig. 11. Identification of Proteins Recognized by Anti-human Rotavirus Recombinant Fab Clones

Viral proteins of HRVWa blotted on the membrane were stained with N28 clone (lane 1), O27 clone (lane 2), rabbit polyclonal antibody against HRVWa (lane 3), or control (without antibody) (lane 4).

明らかとなった (Fig. 11).

3-7. 抗ロタウイルスリコンビナント Fab の臨床応用の可能性 今回ロタウイルス抗体価が高値であった2名の健常人の末梢血リンパ球から構築したライブラリーより得られた抗ロタウイルスリコンビナント Fab は、内殻タンパク質である VP6 を認識していることが明らかとなった。ロタウイルス活性の中和に関連する抗原である VP4 あるいは VP7 を認識するものではなかったことから、生体への直接投与によるロタウイルス感染症の治療や予防には適用できないが、生体試料中からのロタウイルスの検出など臨床検査分野への応用が期待される。さらに、これらリコンビナント Fab クローンの各種ロタウイルスに対する反応特異性の違い、すなわち、N ライブラリークローンは、HRVWa, AU1, AU-64, RRV に対してほぼ同等の反応性を示したのに対して、O ライブラリークローンは、HRVWa に対して優位に反応したことを考慮すれば、これらのリコンビナント Fab クローンを使い分けることにより、生体試料中からのロタウイルスの検出 (N ライブラリークローン使用) や同定 (O ライブラリークローン使用) など、より詳細な解析が可能になるものと期待される。

4. 癌抗原に対するヒト型リコンビナント Fab の単離を目指した取り組み

本章では、癌の診断や治療に有用な完全ヒト型抗体医薬の開発を目指したわれわれの取り組みを紹介する。

4-1. 分子標的としての CD98 抗原 CD98¹²⁾ は、H 鎖 (85 kDa: タイプ II 型膜結合蛋白質) と L 鎖 (40 kDa: 12 回膜貫通型 L-アミノ酸トランスポータ) のヘテロ 2 量体として検出される細胞表面抗原である。CD98 は、ほぼすべての増殖細胞、特に癌細胞では由来を選ばず発現していることから、癌患者においては免疫応答の標的になり易いと考えられる。これまでに、CD98 に対するマウスモノクローナル抗体は多数作製されており^{13,14)} 中には細胞増殖抑制などの生物活性を持つものも単離されている。しかしながら、いまだに CD98 に対するヒト型抗体単離についての報告はない。そこでわれわれは、ファージディスプレイ法により、CD98 に対して高い特異性と親和性を有し、癌治療に応用可能なヒト型リコンビナント Fab を作製することを計画した。

4-2. MALT リンパ腫を発症した患者の骨髓細胞より作製した抗体遺伝子ライブラリーから単離したリコンビナント Fab の性状解析 C 型肝炎陽性でシェーグレン症候群に Maltose-associated lymphoid tissue (MALT) リンパ腫を合併した患者から得た骨髓細胞を出発材料として、抗体遺伝子ライブラリーを構築した。抗体提示ファージライブラリーを CD98 抗原タンパク質 (抗 CD98 抗体キャプチャー HeLa 細胞破碎液) に対して 5 ラウンドのパニングを行ったが、CD98 と反応するリコンビナント Fab クローンは得られなかった。そこで、CD98 陽性 HeLaS3 細胞の生細胞に対して 5 ラウンドのパニングを行ったところ、HeLaS3 細胞と反応する複数のリコンビナント Fab クローンが得られた。シーケンス解析の結果これらのクローンはシングルクローンであることが明らかとなった。リコンビナント Fab の認識する抗原を、HeLaS3 細胞を用いた免疫沈降法及び LC-MS/MS で解析したところ、カルシウム及びリン脂質に結合するタンパク質ファミリーであるアネキシン¹⁵⁾ の一分子種アネキシン A2 であることが示唆された。今後はアネキシン A2 の癌マーカーとしての有用性について検討していく予

定である。

4-3. MALT リンパ腫患者由来抗体遺伝子ライブラリーからの抗 CD98 リコンビナント Fab 単離の試み 一連の検討でわれわれは、当初の目的であった CD98 と反応するリコンビナント Fab を得ることができなかった。われわれは、CD98 と反応し細胞増殖抑制活性を有するモノクローナル抗体 HBJ127 の遺伝子クローニングとリコンビナント Fab としての発現に成功している。¹⁶⁾ そこで、Figini ら¹⁷⁾によって報告されたマウスモノクローナル抗体遺伝子をガイドとして抗原特異的ヒト型抗体を作製するガイド選択法による CD98 特異的ヒト型リコンビナント Fab の単離について検討することを計画した。現在、MALT リンパ腫患者由来抗体遺伝子ライブラリーの H 鎖部分をクローン化 HBJ127H 鎖に置き換えたマウス-ヒトヘテロライブラリーの構築中である。今後は、ライブラリーを CD98 抗原タンパク質あるいは CD98 陽性細胞に対してパニングを行い、CD98 反応性クローンを単離し、さらに、HBJ127H 鎖をヒト抗体 H 鎖ライブラリーに置き換え、同様にパニングを行い、CD98 反応性完全ヒト型リコンビナント Fab を単離していきたいと考えている。

5. おわりに

抗体ファージディスプレイは、感染症、自己免疫疾患あるいは癌患者の免疫細胞から、診断や治療に有用な完全ヒト型抗体を作製する方法として非常に有用である。しかしながら、抗原結合活性に加えて生物活性を合わせ持つヒト型抗体を効率よく得るためには、実験系の様々なステップにおいて、用途に応じた工夫が必要である。さらには遺伝子工学的手法を用いて、得られた抗体の機能改良（例えば抗原親和性の向上など）や機能付加（細胞障害活性の増強など）を行う必要が生じるかもしれない。今後の抗体医薬の展望については、増保の総説¹⁸⁾が詳しいが、副作用の少ない分子標的治療薬としての完全ヒト型抗体のニーズは今後益々大きくなるものと思われる。反面、抗体医薬はコストが高く、患者負担が大きくなるなどのデメリットを持つ。また、開発過程が多くの特許で縛られておりローヤリティの支払い等もコスト高に拍車を掛けているのが現状である。ところで、自己の免疫細胞由来で自己の癌細胞を攻撃する抗体医薬が開発できれば、テーラーメイ

ド癌治療も夢ではないと考えられる。われわれは、このような夢の実現に向けて今後も精力的に研究を進めていきたいと考えている。

謝辞 本稿で紹介した研究のほとんどは、秋田大学医学部附属病院薬剤部において行われたものであり、研究の機会を与えていただきました秋田大学医学部附属病院薬剤部鈴木敏夫教授に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行にあたり共同研究者としてご尽力いただきました秋田大学医学部（現長崎大学医学部）中込 治教授、近畿大学薬学部益子 高教授及び大野喜也大学院生、金沢医科大学医学部正木康史講師、秋田大学医学部附属病院薬剤部井上和幸主任に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Burton D. R., Barbas III C. F., *Adv. Immunol.*, **57**, 191-208 (1994).
- 2) Winter G., Griffiths A. D., Hawkins R. E., Hoogenboom H. R., *Ann. Rev. Immunol.*, **12**, 433-455 (1994).
- 3) Webster R. E., "Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual," Chap. 1, eds. by Kay B. K., Winter J., McCafferty J., Academic Press, San Diego, 1996, pp. 1-20.
- 4) Hoogenboom H. R., "Antibody Phage Display: Methods and Protocols," *Methods in Molecular Biology* Vol. 178, Chap. 1, eds. by O'Brien P. M., Aitken R., Humana Press, Totowa, 2002, pp. 1-37.
- 5) Coomber D. W. J., "Antibody Phage Display: Methods and Protocols," *Methods in Molecular Biology* Vol. 178, Chap. 9, eds. by O'Brien P. M., Aitken R., Humana Press, Totowa, 2002, pp. 133-145.
- 6) Sanna P. P., "Antibody Phage Display: Methods and Protocols," *Methods in Molecular Biology* Vol. 178, Chap. 35, eds. by O'Brien P. M., Aitken R., Humana Press, Totowa, 2002, pp. 389-395.
- 7) Okazaki A., Shoji-Hosaka E., Nakamura K., Wakitani M., Uchida K., Kakita S., Tsumoto K., Kumagai I., Shitara K., *J. Mol. Biol.*, **336**, 1239-1249 (2004).
- 8) Yamane-Ohnuki N., Kinoshita S., Inoue-

- Urakubo M., Kusunoki M., Iida S., Nakano R., Wakitani M., Niwa R., Sakurada M., Uchida K., Shitara K., Satoh M., *Biotechnol. Bioeng.*, **87**, 614–622 (2004).
- 9) Itoh K., Nakagomi O., Suzuki K., Inoue K., Tada H., Suzuki T., *J. Biochem.*, **125**, 123–129 (1999).
- 10) Prasad B. V., Wang G. J., Clerx J. P. M., Chiu W., *J. Mol. Biol.*, **199**, 269–275 (1988).
- 11) Itoh K., Suzuki T., “Antibody Phage Display: Methods and Protocols,” *Methods in Molecular Biology* Vol. 178, Chap. 15, eds. by O’Brien, P.M., Aitken, R., Humana Press, Totowa, 2002, pp. 195–199.
- 12) Diaz Jr. L. A., Fox D. A., *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, **12**, 25–32 (1998).
- 13) Hynes B. F., Hemler M. E., Mann D. L., Eisenbarth G. S., Shelhamer J., Mostowski H. S., Thomas C. A., Strominger J. L., Fauci A. S., *J. Immunol.*, **126**, 1409–1414 (1981).
- 14) Masuko T., Abe J., Yagita H., Hashimoto Y., *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **76**, 386–394 (1985).
- 15) Mollenhauer J., *Cell. Mol. Life Sci.*, **53**, 506–507 (1997).
- 16) Itoh K., Inoue K., Hirooka K., Maruyama K., Ohkawa M., Matsui K., Tada H., Enomoto T., Hashimoto Y., Suzuki T., Masuko T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, 1313–1321 (2001).
- 17) Figini M., Obici L., Mezzanzanica D., Griffiths A., Colnaghi M. I., Winter G., Canevari S., *Cancer Res.*, **58**, 991–996 (1998).
- 18) Masuho Y., *FARUMASHIA*, **42**, 829–834 (2006).