

2005年5月30日

独立行政法人 理化学研究所  
独立行政法人科学技術振興機構

## 生物多様化の仕組みを応用した迅速で自在な抗体作製法を開発

- がん・トリインフルエンザなどの治療・診断薬の迅速開発手段を提供 -

### ◇ポイント◇

- 生物の多様性を生み出す性の仕組みを応用して、試験管内で抗体遺伝子の多様性を高める事に成功。
- 医療分野などに利用価値の高いモノクローナル抗体を迅速に作製する手法(ADLib法)を開発。
- 実験動物を用いずに、少量の抗原を用いて、これまで不可能だった抗体のデザインも可能に。

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）、独立行政法人科学技術振興機構（JST、沖村憲樹理事長）、および財団法人埼玉県中小企業振興公社（小坂孝理事長）は、生物の多様性を生み出す性の仕組みを応用して、医薬品等に用いられる抗体を1週間程度で実験動物を用いずに作製する新技術を開発しました。本研究は JST 戦略的創造研究推進事業 チーム型研究（CREST タイプ）、JST と埼玉県の地域結集型共同研究事業の一環で実施されました。理研中央研究所（茅幸二所長）遺伝ダイナミクス研究ユニットの瀬尾秀宗客員研究員と太田邦史ユニットリーダー、柴田上席研究員研究室の柴田武彦上席研究員らのグループによる成果です。

抗体は、生体が病原体の感染を受けたときに獲得される免疫の中心的な役割を担うタンパク質です。病原体などには無数の種類があり、それぞれに対して専用の抗体が用意されるため抗体遺伝子も無数に必要です。この多様性は生物の多様性を生み出す性の仕組みにも見られる DNA 再編成（切りつなぎ反応）によって獲得されます（利根川進博士がこの発見でノーベル賞受賞）。また、抗体は体が作り出す自然の医薬品（例：ワクチンは弱い病原体を体に注射して抗体を事前に体内に作って病気への抵抗力を持たせるものです）で、抗ガン剤などの医薬品にも利用されています。しかし、病原体などの抗原を実験動物に注射後、数ヶ月経過しないと良い抗体はできませんし、注射すると動物が死んでしまう病原体毒素や、異物として認識されにくい種間で保存された因子に対しては良質な抗体が得にくい、という問題がありました。

本研究では、ニワトリ由来の免疫細胞を用いて、試験管内で抗体遺伝子の DNA 再編成を促進する事に成功し、この現象を利用してわずか1週間程度でモノクローナル抗体<sup>\*1</sup>（1種類の抗体だけで構成される純粋な抗体）を作製する手法(ADLib法)を開発しました。ADLib法では、抗原量も低減でき、従来作製が難しかった抗体も作製が可能になります。

本研究の成果は、医学生物学での利用価値の高いモノクローナル抗体を迅速に供給する日本発の画期的な新手法を提供するもので、新世代の抗がん剤の開発、トリインフルエンザなど新興感染症やバイオテロの影響拡大阻止などへの、社会的に重要な分野への早期の展開が期待されます。本研究成果は、『Nature Biotechnology』電子版5月29日号（日本時間30日付け）に掲載されます。

## 1. 背景

人間などの高等脊椎動物の体には、体外から侵入する細菌・ウイルスなどの病原体や、危険物質、がん細胞などの異物から生命を守るために獲得免疫系が存在しています。獲得免疫系の主要なプレイヤーの一つに、Bリンパ球が産生する抗体があります(図1)。これは、免疫グロブリン<sup>\*2</sup>というタンパク質が実体であり、特異的に異物を認識・結合して活性を中和したり、他の免疫細胞の捕食を誘導したりして異物の排除を行います。無数の異物を認識するために、抗体の一部(可変領域)をコードする遺伝子では、DNAレベルでの再編成が起き、多様な抗体遺伝子配列を持つBリンパ球の集団が生じます(この発見により、利根川進博士がノーベル賞受賞)。このDNA再編成を通じた遺伝子多様化の仕組みは、生物が子孫の遺伝子を多様化しつつ、環境変動に適応して生き残ろうとする性の過程にも見られるものです。また、それぞれのBリンパ球細胞からは必ず一種類の免疫グロブリンが産生されると言う原則があります。

モノクローナル抗体はこの性質を用いて細胞工学的に得られる抗体であり、特定の抗原に対する決まった結合性(特異性)を有し、細胞培養技術を用いて大量に合成できる特質を持ちます。そのため、モノクローナル抗体は狙った通りの効果を得やすく、反応医学生物学の研究用試薬や、診断薬に重用されています。また、最近では乳がんの治療薬ハーセプチンなどの抗がん剤や、リウマチなどの免疫疾患の治療薬などの抗体医薬<sup>\*3</sup>に世界的に大きな注目が集まっています。2002年の米国における臨床試験中のバイオテクノロジー医薬品371種類のうち、77種類が抗体医薬品であり、現在もその傾向は増大中です。また、抗体医薬の市場は急速に拡大しており、2010年の米国の市場規模は約5兆円規模にもなるとの予想があります。

しかし、モノクローナル抗体作製は実験動物に免疫して抗体を得るまでに時間がかかり、最低10週間程度、通常は4-6ヶ月程度の作製期間が必要です。また、当初は実験動物に注射して免疫感作するので、異物として認識されにくい生物種間で保存されたタンパク質、糖鎖、病原体、毒素、立体構造の変質が起きやすい膜タンパク質などの中には、抗体作製が大変困難なものが存在します。これらを解決する手段として、実験動物を使わない生体外抗体作製法が提唱され、その一つとしてファージディスプレイ法<sup>\*4</sup>などが開発されましたが、完全な形を持つ抗体を得るまでには組換えDNAなどの操作を経る必要もあり、より理想的な生体外抗体作製法の登場が待望されていました。

## 2. 研究の手法

ヒトやネズミでは利根川博士が見出したV(D)J組換えによって抗体遺伝子が多様化しますが、ニワトリやウサギなどの抗体遺伝子多様化は遺伝子変換という相同DNA組換えの一種によってもたらされる事が明らかになっています(図2)。また、当研究グループでは、性の過程で見られる遺伝子の多様化が、クロマチン構造(染色体DNAがヒストンなどのタンパク質と結びついてできる構造体)の変化によって制御されていることを明らかにしてきました。

本研究では、性の過程における遺伝子多様化の仕組みを応用して、ニワトリBリンパ球細胞由来の培養細胞株DT40<sup>\*5</sup>の抗体遺伝子座における遺伝子変換を活性化し、それによって得られた多様化細胞ライブラリーから、抗原を固定した磁気ビー

ズを用いて、抗原特異的に結合性を示すモノクローナル抗体を産生する細胞クローンの分離を試みました。

性の過程における遺伝子多様化では、染色体の一部でクロマチン<sup>※6</sup>を構成するヒストンのアセチル化を通じてクロマチンがゆるみ、DNAが露出した状況が生まれ、その場所でDNA再編成が活性化されることをこれまでに明らかにしてきました。そこでまず、クロマチンを弛緩する働きを持つ薬剤トリコスタチンA(TSA)<sup>※7</sup>でDT40細胞を処理し、抗体遺伝子におけるDNA再編成の頻度を測定しました。DNA再編成の頻度は、細胞表面に提示される抗体(IgM)の有無を蛍光細胞分取解析装置(FACS)で測定する事で調べることができます。

次に、多様化した抗体遺伝子座を持つ細胞集団から、狙った抗原を固定した磁気ビーズを用いて、その抗原に結合する抗体を産生し、細胞表面に提示しているDT40細胞クローンを単離しました。引き続きこの細胞クローンを培養し、細胞表面の抗体の性質や、培養上清に分泌された抗体(IgM)の結合特異性や、抗原との結合の強さ(Kd)などの生化学的性質を、酵素免疫抗体法(ELISA)や表面プラズモン共鳴解析機(BiaCore)などを用いて決定しました。

### 3. 研究成果

まず、DT40細胞をTSAで処理する事により、ニワトリ抗体遺伝子座のヒストン・アセチル化レベルや、抗体可変領域の遺伝子配列の多様性が著しく増大する事を確認しました(図3)。この結果は、TSA処理によって多様な抗体遺伝子を持つ細胞集団・ライブラリーが自動的に生成された事を意味します。そこで、このライブラリーをAutonomously Diversifying Library(自立多様化ライブラリー)の頭文字を取ってADLibと呼ぶ事にしました。

次に、このライブラリーから、特定のタンパク質抗原を固定した磁気ビーズを用いて、抗原に特異的に反応する抗体を産生するクローンをつり上げる実験を行いました(図4)。その結果、ウサギやヒトの免疫グロブリンタンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体が、1週間という短期間で入手できる事が明らかになりました(図5)。また、ライブラリーから選択してきた細胞クローンの中には、どのような抗原にもベタベタと非特異的に結合する抗体が産生されるものが存在していました。そこで、目的抗原を固定した測定プレートと全く無関係の対照抗原を固定した測定プレートを用いて同時に結合価を測定し、目的抗原にのみ選択的に結合する抗体産生クローンを選択する事で、効率的に特異的なモノクローナル抗体を入手する事ができました。また、上記の技術全体をさして、ADLib法と呼ぶ事にしました。

### 4. 今後の展開

今回理研が開発したADLib法では、生物学・医科学やプロテオミクス研究に欠く事のできないツールであるモノクローナル抗体を、1 $\mu$ g未満の抗原から最短1週間で作製する事ができます(図6)。この手法により、抗体試薬や抗体診断薬・抗体医薬品の開発期間が大幅に短縮できるほか、従来は抗体作製が困難であった抗原でもモノクローナル抗体を作製できるようになります。これにより、プロテオミクスなどの基礎研究の著しい進展が見られたり、これまでにない新しい作用を

持った抗体医薬品開発に発展したりする可能性があります (図 7)。

また、抗体作製期間が大変短いので、トリインフルエンザや SARS などの新興感染症の登場や、バイオテロなどに際し、診断薬や中和抗体を迅速に作製・供給して急速な拡大を阻止するなど、安全・安心な社会の構築に寄与する事ができるものと期待されます。

なお、本研究は JST の戦略的創造研究推進事業 チーム型研究(CREST タイプ) 「ゲノムの構造と機能」研究領域 (研究総括:大石道夫 (財) かずさ DNA 研究所 所長) および、JST と埼玉県による地域結集型共同研究事業「高速分子進化による高機能バイオ分子の創出」(事業総括:大関正弘 前日本薬学会常任理事) 等の助成により実施され、本研究成果の実用化のために、理研ベンチャー制度を利用して株式会社イオム・バイオサイエンス (藤原正明社長) が 2005 年 2 月に設立されています。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 中央研究所  
遺伝ダイナミクス研究ユニット

ユニットリーダー 太田 邦史

Tel : 048-467-9538 / Fax : 048-462-4671

(戦略的創造研究推進事業について)

独立行政法人科学技術振興機構

戦略的創造事業本部 研究推進部 研究第一課

佐藤 雅裕

Tel : 048-226-5635 / Fax : 048-226-1164

(地域結集型共同研究事業について)

独立行政法人科学技術振興機構

産学連携事業本部 地域事業推進部 地域支援課

水野 充

Tel : 03-5214-8448 / Fax : 03-5214-8487

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

独立行政法人科学技術振興機構

総務部広報室 阿部 学

Tel : 03-5214-8404 / Fax : 03-5214-8432

## <補足説明>

### ※1 モノクローナル抗体

一つのリンパ球からは一種類の抗体分子しか生産されない事を利用し、リンパ球とリンパ球がん細胞とを融合して得られるハイブリドーマを作製して得られる単一分子種の特異抗体。特定の性質を持つ抗体を大量開発する事ができるため、診断薬や抗ガン剤などへの利用価値が高い。発明者である Kohler と Milstein は 1984 年にノーベル賞を受賞。

### ※2 免疫グロブリン

獲得免疫を担う Y 字型の糖タンパク質。可変領域は抗体ごとに異なり、抗原に特異的に結合し、他の免疫細胞の捕食を助けたり、病原体の毒素や働きを中和したり、補体系の活性化を行う。定常領域にはヒトでは 5 種類が存在し、その構造によって IgG、IgM、IgD、IgE、IgA の抗体クラスが決定される。

### ※3 抗体医薬

モノクローナル抗体を利用した分子標的医薬品。最近の代表例としては、一部の乳ガン患者に対する抗ガン剤である「ハーセプチン」が知られている。

### ※4 ファージディスプレイ

大腸菌に感染する病原体であるファージの粒子タンパク質遺伝子に、多様性を持った抗体遺伝子ライブラリーを組み込み、目的抗原に結合するファージを回収して、擬似的なモノクローナル抗体を得る手法。実用には得られた遺伝子を改変して、完全抗体にする必要がある。

### ※ 5DT40 細胞

ニワトリ B リンパ球細胞由来の培養細胞株であり、無限増殖能力を有する。低頻度ながら抗体遺伝子座での組換えが観察されるほか、条件によっては抗体遺伝子座の体細胞突然変異が誘発可能である。表面レセプター型と分泌型の IgM を産生することが出来る。体細胞相同 DNA 組換え頻度が高いという特性があり、実験室レベルの遺伝子ターゲティング実験に多用される。京都大学・武田俊一教授と独 GSF(Gesellschaft für Strahlenforschung)の Jean-Marie Buerstedde 教授が共同研究の中で 1991 年に発見・報告した。

### ※6 クロマチン

真核生物の染色体はヒストンや非ヒストンタンパク質が DNA と結合し、階層的で高次の構造を作り上げている。このような構造をクロマチン構造と呼ぶ。クロマチン構造の変化、とりわけその基本単位であるヌクレオソームの配置は遺伝子発現に重要な役割を果たすことが知られているが、最近ではその他の DNA 代謝反応の制御にも重要であることが示されつつある。

## ※7トリコスタチン A

ヒストン H3 もしくは H4 の N 末端部分のリジン残基のアセチル化を除去する酵素（ヒストン脱アセチル化酵素）の阻害剤。結果的にヒストンのアセチル化を昂進する働きがある。理化学研究所の吉田稔主任研究員が発見者。

図 1 病原体への対抗手段としての抗体遺伝子の多様化

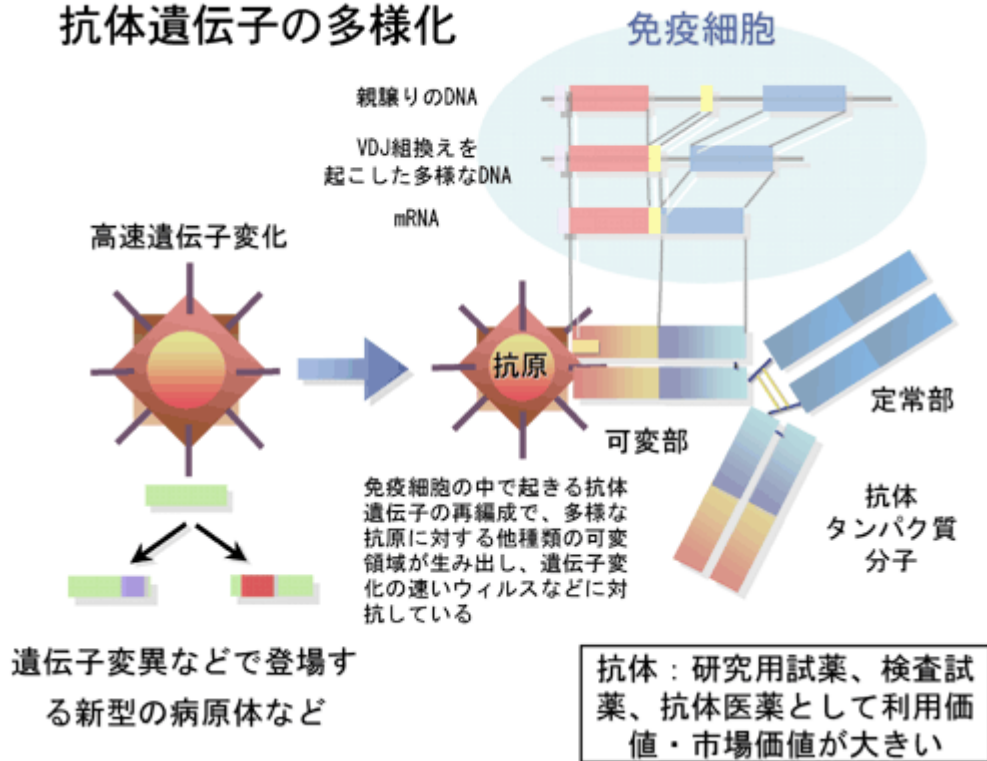
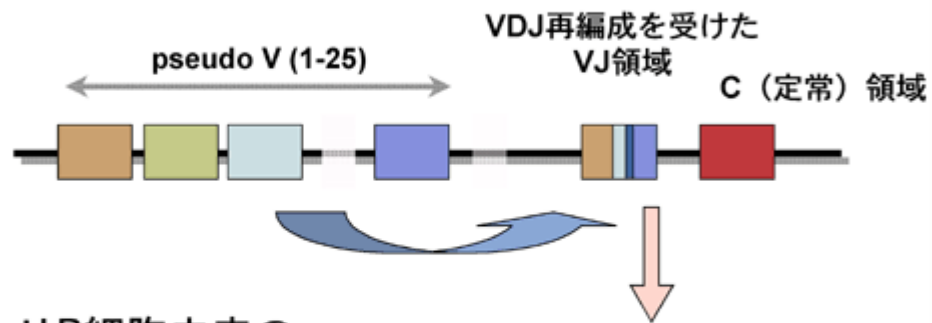


図2 ニワトリDT40細胞株では、遺伝子変換という相同DNA組換えが起きる事で、抗体遺伝子座の多様性が生まれる



ニワトリB細胞由来のDT40細胞では、培養細胞で抗体遺伝子の遺伝子変換が低頻度ながら起きる。

抗体遺伝子の多様化が起き、様々な異物に対応した多様なB細胞から抗体が産生される。

図3 クロマチンを弛緩する働きを持つTSAの処理によって60-90%ものDT40細胞が遺伝子変換を起こしIgM<sup>+</sup>の細胞となる

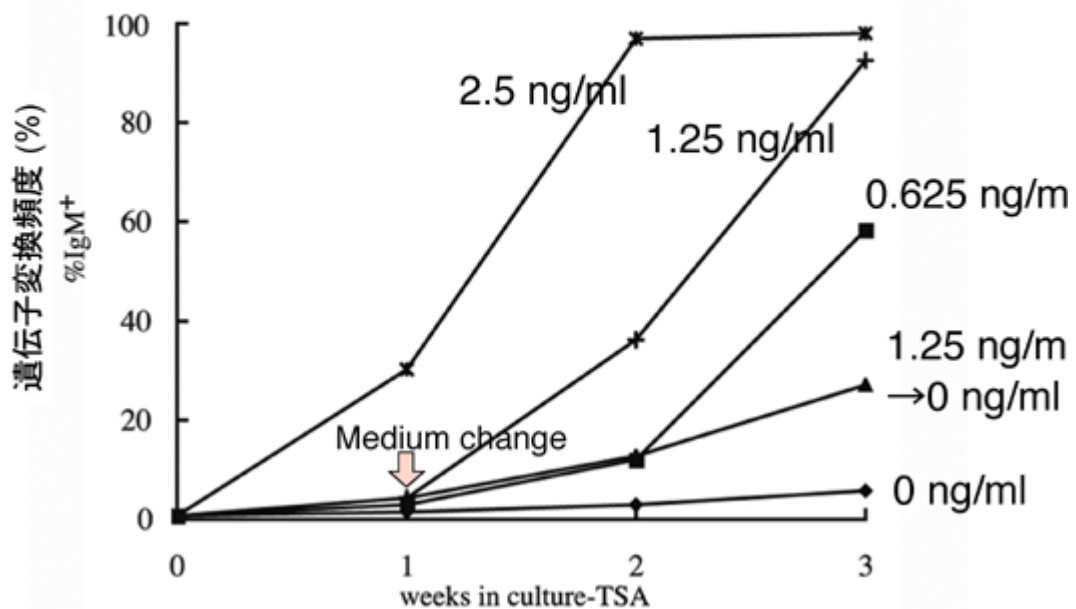


図4 ADLib法の原理：自律多様化ライブラリーから特異抗体産生細胞を抗原固定した磁気ビーズでつり上げる

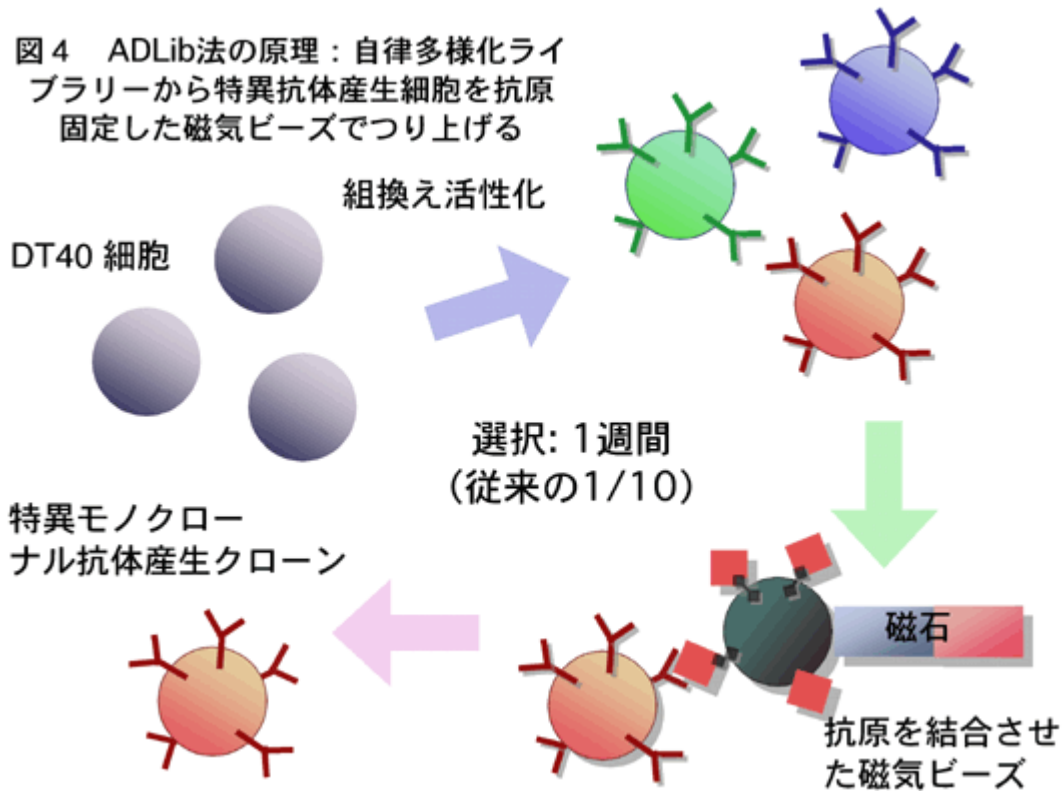
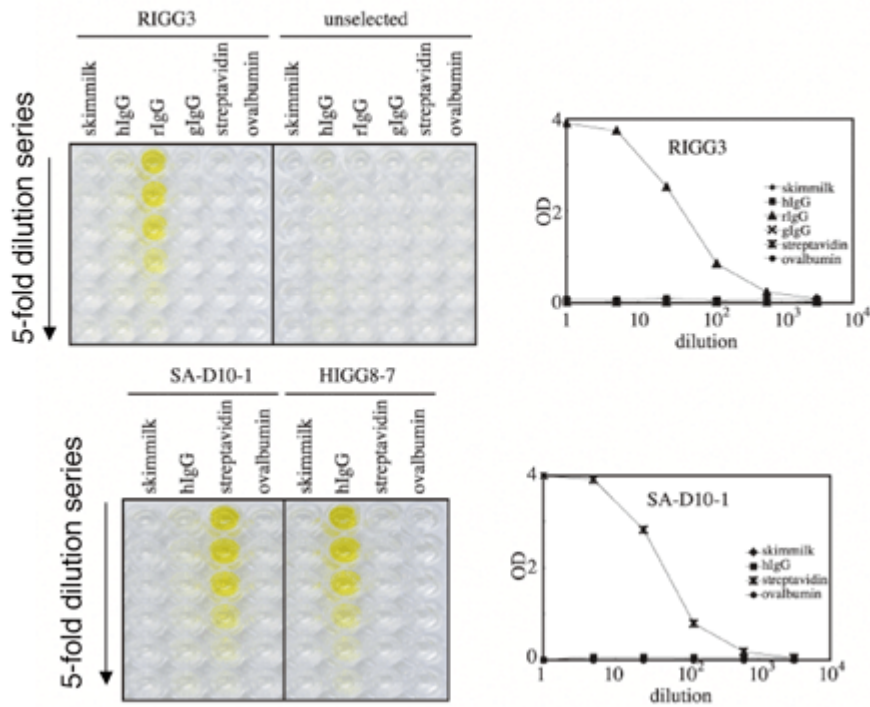


図5 ウサギIgGとストレプトアビジンに対する特異抗体を産生するDT40 細胞のスクリーニング結果





## 図6 既存技術との比較

	ADLib法	従来方法 マウス・ モノクローン抗体	最近商業化された ファージディスプレイ 法
適応可能抗原 の範囲	自己抗体、 抗毒素抗体、抗体酵素 が可能	不可	自己抗体、 抗毒素抗体、抗体酵素 が可能
スピード	1-2週間	2-6ヶ月	10週間
抗原量	1 $\mu$ g - 数百 ng	数百 $\mu$ - mg	数百 $\mu$ g
抗体の形状	完全抗体	完全抗体	ファージ粒子
自動化	可能	不可	可能
施設・設備	通常実験室で十分	動物飼育施設が必要	組換えDNA実験可能 な実験室

## 図7 将来の展望・社会的意義

