

ファージディスプレイによる抗体作製

中島敏博

(財) 化学及血清療法研究所第一研究部第二研究室

0968-37-3100、 nakashima-to@kaketsuken.or.jp

1. 緒言

ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーが報告されて 10 年がたち、ファージディスプレイ法で作製された完全ヒト抗体の臨床応用や受託作製も始まった。ファージディスプレイ法は、機能を担うペプチドや蛋白質（表現型）とそれをコードする DNA（遺伝型）を同一分子上で対応づけ、試験管内高速進化実験系を実現した優れたディスプレイシステムの一つとして急速に発展してきた。抗体作製への応用は、1990 年に McAfferty 等¹⁾が、抗体機能ドメインを提示したファージディスプレイ法をハイブリドーマ法に変わる新しいモノクローナル抗体作製技術として報告したのに始まる。1991 年には、Marks 等が免疫していないヒトの末梢血リンパ球を出発材料に構築したファージ抗体ライブラリーから、ヒト生体成分を含め複数の抗原に対するファージ抗体の分離を報告し²⁾、ファージディスプレイヒト抗体ライブラリーは試験管内で生体内の抗体産生系を模倣し、更に生体の免疫系の制限から独立した抗原の種類を選ばない優れたシステムとして、完全ヒト型抗体作製への新たな道を開き、抗体医薬開発に大きなインパクトを与えた。本稿では、ヒト抗体作製の為のファージディスプレイライブラリーとその課題を紹介したい。

2. ファージディスプレイヒト抗体ライブラリー

(1) ファージディスプレイ法

ファージディスプレイ法は大腸菌ウイルスの一種である M13 などの繊維状ファージのコート蛋白質（gene III 蛋白質（g3p）など）にファージの感染能を失わないように外来遺伝子を融合蛋白として発現させるシステムである。基本的にこの方法は最初にランダムな集団を発生させ、多様な配列空間中で目的の機能を持つ配列をサーチしようとする分子多様性法として位置づけられ、その優れた点として、次の項目が上げられる。①一度に 10^7 種以上の多種類の分子種を提示したファージライブラリーを構築できる、②一つのファージ粒子には、1 種の蛋白質、ペプチドが発現しているので、粒子毎に目的の機能や性質を持った分子種を選択することができる、③ファージ粒子内の DNA にはファージ上に発現している蛋白質、ペプチドをコードする遺伝子が含まれており、選択したファージを大腸菌に感染させることで簡単に複製増殖でき、またその DNA 配列からアミノ酸配列を簡単に決定することができる。

Winter らは 1991 年²⁾、ファージ上に抗体の可変領域が機能的に提示され、スクリーニングにより特異抗体が分離できることを報告し、試験管内完全ヒト型抗体作製法として抗体医薬開発に大きなインパクトを与えた。

(2) 抗体ライブラリーの種類

世界中で様々なヒト抗体ライブラリーが報告されている。その主要なものを以下に示す。

1) Naïve/non-immunized library

これは正常なヒトが保有する VH、VL 遺伝子を RT-PCR により分離し、ランダムに組み合わせた scFv や Fab として抗体可変領域を提示したコンビナトリアルライブラリーである。通常、正常人の末梢血、骨髄、扁桃腺などのリンパ球を出発材料とし、複数（数十人）のドナーを用いることでより多くの多様性を有するライブラリーを構築する。このライブラリーではドナーの疾病履歴、抗体価、遺伝系等のバックグラウンド等の選択が難しく、V 遺伝子の組成や由来のコントロールに課題がある。これらの V 遺伝子のバイアスを無くすため、IgM 由来の mRNA のみを VH 遺伝子の増幅に用いているものが特に naive library として分類されている²⁾。

2) synthetic library

ヒトの B 細胞内で実際の抗体産生に用いられる機能的な V 遺伝子断片と相補性決定領域 (CDR) 3 に相当する領域に適当な長さのランダムなアミノ酸配列が組み込み込まれるような合成オリゴ DNA を用いて抗体可変領域遺伝子を構築し、抗体の多様性を人工的に創出したライブラリーが作製されている³⁾。

特に、ヒトの生体内での B 細胞で使用頻度の高い少数の V 遺伝子断片のみをベースにしたライブラリーや物理化学的に安定なフレームワークと各 CDR 断片を組み合わせたライブラリーの構築などが報告されている^{4)、5)}。V 遺伝子の組成がかなりコントロールでき、純粋な試験管内でのヒト抗体成熟系の基盤ライブラリーと見ることも出来る。一方、何処までがヒト由来とするか課題もある。

3) immune library

感染症回復者や対象抗原をワクチネーションして血中抗体価を上昇させたヒトや自己抗体を保有する患者、担癌患者などのリンパ球を出発材料として RT-PCR により増幅した V 遺伝子より構築したライブラリーである。自己抗体の解析や、中和活性を有する各種感染症に対する抗体の創出に有効と考えられる。ライブラリーサイズは小さくても、かなり高い確率で特異性、親和性の高いヒト抗体可変領域を分離できる利点がある一方、対象抗原によっては、リンパ球ソースの入手の困難さや対象抗原毎にライブラリーを構築しなければならない手間が掛かる欠点がある。

実際に、我々もヒト第 VIII 因子 (FVIII) に対するインヒビター抗体を有する一人の患者から、ファージ抗体法を用いて FVIII に高い親和性 (10^{-11} M) を有し、FVIII の活性を阻害する scFv クローンの世界で始めて分離することに成功している⁶⁾。

Sharon 等は in-cell PCR 法による B 細胞内での VH-VL 遺伝子アッセムブリーを応用したライブラリーを構築することによる、ヒトが生体内で産生する抗体と同一の組み合わせの VH、VL 可変領域を有する特異的な完全ヒト抗体作製法を報告している⁷⁾。ワクチンや自己抗体が存在する抗原に対する抗体作製方法として、特に感染症領域や抗毒素に於ける組換えヒトポリクローナル抗体製剤への道を開くものとして注目される。

4) shuffling による gene replacement 法によるマウス抗体からの完全ヒト抗体の創出

guided selection と呼ばれ、マウスモノクローナル抗体をベースに chain-shuffling 法を用いて、同様の特異性を有するヒト抗体可変領域を創出する方法が報告されている⁸⁾。世界初のファージ抗体法により臨床応用された抗 TNF- α 抗体 (D2E7) は本法により創製されていることが報告されている。

(3) 抗体ライブラリー構築とその課題

基本的にファージディスプレイヒト抗体ライブラリーにおける抗体の多様性は、多種類の VH 遺伝子

と VL 遺伝子をランダムに組み合わせたコンビナトリアルライブラリーを構築することにより達成される。ライブラリー構築に当たって、まず以下の点を考慮すべきであろう。

- 1) V遺伝子のソースと構築：immunized か naïve/non-immunized 或いは synthetic library か、など
- 2) 提示フォーマット：scFv 或いは Fab もしくは V ドメイン
- 3) phage vector か phagemid vector か

scFv はファージ上で融合蛋白として、比較的よく発現するが、分離後の scFv の発現や解析に技術が必要である。Fab の場合は、大腸菌での発現量にばらつきが大きく、また一般的に scFv よりも発現量が少なく、提示量も少なくなる傾向が認められている。また、最近ヒト V 遺伝子の物理化学的安定性の解析が進み⁹⁾、安定性に優れた VH ドメインをベースにしたライブラリーの構築も報告されている¹⁰⁾。

naïve/non-immunized 或いは synthetic library から高い親和性、特異性を有するクローンを直接得るには最初のライブラリーのクローン数が重要であり、一般に 10^9 以上必要と言われている。しかし、膨大なサイズを有するライブラリーの構築には極めて多くの労力と時間、コストが必要となる。

抗体分子の変領域の形態空間は異なった 10^8 程度の分子種で十分カバー可能であることが理論的には予想されている¹¹⁾。また、スクリーニング効率などから、実効としてのライブラリーサイズは $10^9 \sim 10^{10}$ 程度が最大サイズとも考えられている。また単純な形質転換体によるクローン数だけでなくライブラリーに含まれるクローンの内、どれだけ実際に scFv や Fab を機能的に発現しているかが、ライブラリーの品質を左右し、また特異クローンの選択に影響を及ぼす。

我々が構築したヒト scFv を提示した 4.6×10^8 クローンからなるライブラリーでは、約 80% 近くのクローンが scFv をファージ上に発現していた。このライブラリーからは、ワクチネーションしたヒトから確立されたハイブリドーマ産生ヒト抗 HBs 抗体と同様の親和性と配列を有する抗 HBs 抗体の他、自己抗原を含めた数十種の抗原に対して数 nM から数百 nM の範囲の親和性を有する scFv クローンが多数分離出来ており、多様性と発現効率が確保できればこのライブラリーサイズで十分に特異性と親和性を有するクローンの分離が可能であることを示している。

ライブラリー構築当たっては、実験系に必要な多様性と発現効率のバランスを高める工夫がライブラリーの品質と特異クローンの選択効率を上げる重要なファクターであると共に、ファージディスプレイ抗体ライブラリーが免疫システムの進化性を試験管内で実現した系であり、抗体分子が進化工学を行う分子であることを認識すべきである。種々の手法で CDR を中心に進化サイクルを適応することにより、試験管内での抗体の親和性の向上や特異性の変換を行えることが明らかにされている。

個々のライブラリーの調製に関しては、成書を十分に参考にして、ライブラリーの設計、作製を行うことを奨める^{12) 13)}。

3. 抗体ライブラリーからの特異抗体の分離/評価と応用

(1) 選択系の設計

選択系の設計は、ファージディスプレイライブラリーのみならず、ディスプレイ技術を使用して機能性分子を分離する場合のキーテクノロジーである。

精製抗原が入手できる場合は、固相化法（パンニング）やビオチン化抗原とストレプトアビジン固定化担体を用いたスクリーニング方法などが報告されているが、対象抗原の目的エピトープを被覆或いは変性させない工夫が必要である。選択系には反応温度や洗浄条件、塩濃度など複数の要因が影響する。

精製抗原を用いたファージライブラリーを用いたスクリーニング系の理論的な解析については片倉等の報告が非常に有用である¹⁴⁾。

最近では、親和性だけでなく、構造や機能でのスクリーニングを行う例やポストゲノムシーケンス時代に対応したハイスループットスクリーニング (HTS) の検討も多くなっており、ニトロセルロース膜上でのスクリーニング¹⁵⁾ やプロテインアレイ¹⁶⁾ を用いた取り組みなどが目を引いている。

(2) 抗体機能ドメインの発現、評価

ライブラリーから分離された目的の特異性を有するクローンはファージ粒子上に提示された形で、ELISA やフローサイトメトリーに応用でき、96 ウェルプレートでの発現などと組み合わせ、HTS への適用も可能である。

しかし、分離されたクローンの特異性や親和性、機能 (中和活性など) を詳細に解析するためには、ファージから切り離して、scFv や Fab の調製を行う必要がある。ここで問題となるのは、得られたクローンがファージ上で g3p との融合蛋白として機能を発揮していたとしても、それらが単独で可溶性に機能を有して発現出来るとは限らないことである。

scFv の場合には、不溶性粒子 (封入体) を形成したり、分泌発現しても scFv 単独で安定な構造を取らず、重合体を形成するなど、また Fab の場合には発現量が極めて少ないなどの課題に多くの場合遭遇する。

scFv の場合には、HisTag 付きで発現させ、封入体を変性剤で抽出精製後、リフォールディングさせることにより、可溶性発現体をかなり効率よく得られることが報告されている¹⁷⁾。また、分子シャペロンの共発現¹⁸⁾ などの効果も報告されているが、クローン間でかなり挙動が異なり、いずれの方法も全てのクローンに効果がある訳ではない。

(3) scFv から Fab、完全抗体分子型への変換

ファージ法で得られた scFv の医薬への応用を考えた場合、完全抗体分子型への変換が必要となる。

scFv から Fab 或いは完全分子型への変換では、70%以上の高い確率で同様の特異性を持つ抗体分子が得られ Kd 値は数倍から数十倍向上することが報告されているが^{19), 20), 21)}、ライブラリーからの特異クローンの分離に比べ報告例は少なく、実際の有効な変換効率は更に低いと推定される。scFv は特性を生かし、diabody や機能性分子との融合、scFv-Fc などの形態での応用が検討されている。

4. おわりに

日本では、黒沢等や、熊谷、津本等の新しいシステムの開発や抗体ドメインの可溶化技術の開発、藤井等の進化工学的な手法を用いた機能性分子創製など優れた研究成果が上がっているものの、抗体工学、ファージディスプレイ法を始めとしたディスプレイ技術の普及、応用という面ではまだ充分とは言えない状況である。特に、特許や事業化という観点ではMRC-Cambridge Antibody Technology (CAT)-Scripps、MorphoSys などの欧米ベンチャー企業が先行し、製薬企業との提携が活発化しているのが実状である。

ファージディスプレイ法は生体内では作製困難であった抗原や、毒素などに対する抗体分子の作製や新しい機能を有する抗体分子創製へ大きな夢を与えている。医療への応用を目指した新たな機能性抗体の創製に対する多くの挑戦と成果を期待したい。

文献

- 1) McCafferty, J. et al. : Nature, 348: 552-554, 1990 他
- 2) Marks, J. D. et al. : J. Mol. Biol., 222: 581-597, 1991
- 3) Griffiths, A. D. et al. : Embo. J., 13: 3245-3260, 1990
- 4) Knappik, A. et al. : J. Mol. Biol., 296: 57-86, 2000
- 5) Chingwei, V. L. et al. : J. Mol. Biol., 340: 1073-81093, 2004
- 6) Arai M. et al. : Thromb Haemost., 82:238a. 1999
- 7) Sarantopoulos, S et al. : J. Immunology, 152: 5344-5351, 1994
- 8) Jespers, L. S. et al. : Biotechnonology, 12:899-903, 1994
- 9) Ewert, S. et al. : J. Mol. Biol., 325: 531-553, 2003
- 10) Soderlind, E. et al. : Nat. Biotechnol., 18:852-856, 2000
- 11) Kaufmann, S. :“自己組織化と進化の論理” 日本経済新聞社 1999
- 12) Barabas III, C. F. et al. : “phage display a laboratory manual” In cold spring harbor laboratory press, 2001. 他
- 13) McCafferty, J. et al. : Antibody Engineering—a Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1996.
- 14) Zhuang, G. et al. : J. Biosci. Bioeng., 91: 474, 2001
- 15) Nakamura, M. et al. : J. Biochem., 129: 209-212, 2001
- 16) de Wildt, R.M.T. et al. : Nature Biotech., 18: 989-994, 2000
- 17) Tsumoto, K. et al. : J. Immunol. Methods, 219: 119-129, 1998
- 18) Bothmann, H. & Pluckthun, A. : J. Biol. Chem., 275: 17100-17105, 2000
- 19) Thompson, J.E. et al. : J. Immunol. Methods, 227: 17-29, 1999
- 20) Krebs, B. et al. : J. Immunol. Methods, 254: 67-84, 2001
- 21) Mahler, S.M. et al. : Immunotechnolgy, 3: 31-43, 1997