

ニワトリモノクローナル抗体の新展開

松田 治男

広島大学大学院生物圏科学研究科 免疫生物学研究室

082-424-7968、hmatsu@hiroshima-u.ac.jp

1. 緒言

ニワトリ抗体の主要な抗体は IgY (H鎖は ν 鎖)(図1)であり、他の抗体として IgM および IgA が存在する。機能的にほ乳類の IgG に匹敵する IgY は、遺伝的に鳥類・は虫類・両生類に共通なクラスターを形成している。中でも鳥類の抗体多様性はほ乳類に劣ることなく精緻である。これは、鳥類が両生類や虫類よりも高度に進化した動物であること、そしてほ乳類とは大きく異なる進化を遂げた結果であると推察することができる。

ニワトリ IgY の特徴は、(1)親和性成熟を伴った抗原特異的な抗体産生ができる、(2)ほ乳類の補体を活性化しない、(3)ほ乳類 Fc レセプターと結合しない、(4)ほ乳類 IgG と交叉反応しない、(5)プロテイン A/G と結合しない、(6)ヒンジ部の可動性が弱い、(7)IgY が選択的に卵黄内に移行する、(8)モノクローナル抗体の作成が可能である、などである。これらの項目の中には、ほ乳類 IgG と比較して不利な特徴もある一方で有利なものもあることから、その優位性を上手く活用することで、ほ乳類抗体を凌ぐ活用も現実となる。さらに、ニワトリがほ乳類と進化を大きく異にすることから、ほ乳類に高度保存された生体分子 (mammalian conserved molecules) を容易に異物として認識して抗体産生する点は、ニワトリ抗体の有用性の一端を想像させる。

そこで本講演では、ニワトリ抗体の特徴からニワトリ抗体の多様性獲得機構、ニワトリモノクローナル抗体の歴史、そしてその新展開の現状と将来について言及してみたい。

2. ニワトリ抗体の多様性獲得機構

緒言に、鳥類の抗体多様性はほ乳類に劣ることなく精緻であると述べた。ほ乳類では、一部の動物を除いて、抗体の多様性は抗体遺伝子の再編成に大きく依存している。一方、鳥類では、抗体遺伝子の再編成は最小限に限定し、むしろ偽遺伝子の遺伝子変換によって多様性の増大が図られている。すなわち、ほ乳類抗体では、H鎖において多数の V 遺伝子、D 遺伝子および J 遺伝子の再編成、L鎖において多数の V 遺伝子および J 遺伝子の再編成、いわゆる V(D)J再編成が行われるが、鳥類では、Hおよび L鎖の両鎖で V(D)J再編成に関する V および J 遺伝子は、いずれもわずかに一つである。その代わりに、V 遺伝子の上流に多数存在する偽 V 遺伝子が再編成を終えた V(D)J 遺伝子の V 遺伝子の中にランダムにコンバートされる(図2)。この現象(遺伝子変換、gene conversion)は、鳥類だけでなくウサギの盲腸でも確認されている。

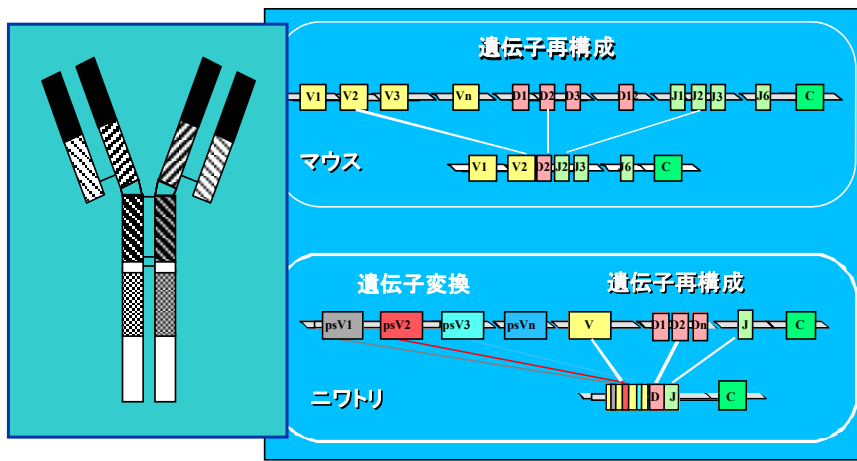


図1 . ニワトリ IgY の構造
 抗体の基本構造はほ乳類と変
 わらないが、H鎖のドメイン
 はひとつ多く CH4 まである。

図2 . 抗体多様性の遺伝子レベルでのメカニズム
 マウスとニワトリとの相違

3 . ニワトリモノクローナル抗体の歴史

ニワトリモノクローナル抗体の作成成功は、1980 年代初頭である。著者のグループがトリレトロウイルス（複製欠損ウイルスであるトリ細網内皮症ウイルス）を用いて、ニワトリの抗 SRBC 抗体産生細胞を直接トランスフォームさせることに成功した[1]。その後、マウスと同様の細胞融合法が、やはり著者らによって開発されるとともに[2]、方法の改善[3,4]が行われた。これまでに、細胞融合法によって作成されたニワトリモノクローナル抗体としては、ニューカッスル病ウイルス[2]、N-グリコシルノイラミン酸（NeuGc）[5,6]、アイメリア原虫[7,8]、プリオンタンパク質（PrP）[9-11]などに対する抗体である（未発表の特異性を持つ抗体は、その他多数に上る）。これらの抗体作成の殆どが著者らによるものである事実は、マウスの系と比較して、微妙な手法の困難さがあるためでもある。

一方、ファージディスプレイ法がニワトリ抗体にも応用されるようになり[12,13]、その方法の改善も進められてきた[14]。著者らのファージディスプレイ法による抗 PrP 一本鎖抗体（scFv 抗体）の数は相当数にのぼり、多くのプリオン研究者に活用されるに至っている。また、scFv 抗体遺伝子に変異置換を導入することで、特異性を高めることにも成功している[著者ら、未発表]。

先にニワトリ抗体遺伝子の特徴を述べたが、ニワトリ抗体遺伝子の扱いの容易さから、可変部抗体遺伝子と定常部抗体遺伝子を利用してインタクト抗体よりも操作性を改善した組み換え抗体分子を真核細胞に発現させることにも成功した[著者ら、投稿準備中]。さらに、ニワトリ可変部とヒト定常部のキメラ抗体を安定発現する真核細胞の樹立もすでに成功している[15]。

4. ニワトリモノクローナル抗体の新展開の現状と将来

ここでは、実際に行われているニワトリモノクローナル抗体の現状を、その技法に分類して概説するとともに、応用例として抗 PrP ニワトリモノクローナル抗体の有用性を紹介することでその将来を展望する。

(1) 細胞融合法

免疫ニワトリ 1 羽から 10^9 個以上の脾臓リンパ球の回収が可能である。これは、細胞融合実験と共に組み換え抗体の作成材料も確保できることになり、融合実験での失敗を組み換え抗体実験でカバーできることを意味する。

融合用ニワトリ細胞株は、チミジンキナーゼ欠損 B 細胞株が使われ、通常の HAT 選抜でハイブリドーマが取得できる。しかし、現在のニワトリ細胞融合法で安定的に抗体産生・細胞増殖ハイブリドーマを得ようとする

(2) ファージディスプレイ法

これまでに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成は、鳥類特有の抗体多様性形成の臓器であるファブリキウス嚢を利用した例 [12]、免疫脾細胞 [13] やハイブリドーマを活用した例 [10] などがある。ほ乳類抗体の場合と作成法は基本的に同様であるが、決定的な相違は、上述したように VH・VL 抗体遺伝子の機能的 V・J 遺伝子が一つしかない点である。すなわち、VH・VL 抗体遺伝子ともに対のプライマーで増幅できることである。

(3) 組み換えニワトリ抗体の真核細胞発現

ニワトリモノクローナル抗体の安定生産と簡便精製を目的に、組み換えニワトリモノクローナル抗体の真核細胞発現用ベクターを開発した（特許出願済み、投稿準備中）。真核細胞発現系は、ハイブリドーマの低レベル抗体産生の欠点を補うだけでなく、ニワトリモノクローナル抗体の応用の幅を広げることになるだろう。前述の通り、IgY はプロテイン A や G と結合しないが、このベクターを使うことで精製用タグ付き抗体として生産できる。

(4) 組み換えニワトリキメラ抗体

組み換えニワトリキメラ抗体は、ニワトリ-マウス/キメラ抗体が始めに作成された [16]。最近著者らは、ヒトへの応用を目的にニワトリ抗体の可変領域とヒト IgG1 および IgG4 の定常領域からなるニワトリ-ヒト/キメラ抗体の作成に成功した [15]。興味深いことに、ニワトリ抗体の可変領域のフレームワークはヒト抗体のそれと約 70% の相同性があり、ニワトリ-ヒト/キメラ抗体はマウス-ヒト/キメラ抗体よりもヒトに近い。糖鎖修飾において、ニワトリのそれがヒトに類似していることから、ニワトリ-ヒト/キメラ抗体の抗体医薬としての将来性が垣間見えてきたと言えよう。

5. ニワトリモノクローナル抗体の実例としての抗 PrP 抗体

PrP の哺乳類間のホモロジーは 80% 以上で、ニワトリと哺乳類間でのそれは 40% 以下である。この事実は、哺乳類 PrP を認識する抗体がニワトリを用いることで容易に作成できることを示唆している。事実、私達の研究室では、これまでに数多くの抗 PrP ニワトリモノクローナル抗体を細胞融合法・ファージディスプレイ法などの方法で作出に成功しており、抗 PrP ニワトリモノクローナル抗体をパネル抗体として確立している。さらに、これ

らの抗体群の中から選抜した抗体遺伝子に変異を導入することで抗原結合性の高い抗体を作ることに成功している（投稿準備中）。興味深いことに、得られた抗体の多くが、ヒトのサンプルに対しては殆ど非特異性を示さない点であり、この点を考慮すると、PrPに限らず他のヒト生体分子の高感度検出にニワトリモノクローナル抗体が応用可能であると思われる。

一方最近、ファージディスプレイ法に用いるナイーブライブラリを作成した。このライブラリを用いた抗体選抜は現在進行中であるが、概ね良好な成績を得ている。これらの抗体を含め、上述した様々な技術を駆使することで、ニワトリモノクローナル抗体をより自在に作成できる現状にあり、今後益々ニワトリモノクローナル抗体の活用の幅が拡大するものと期待される。

6. 謝辞

本研究の成果の一部は、(独)農業・生物系特定産業技術研究機構・生研センターの補助「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」(平成12-16年度)により推進したものであり、ここに深謝する次第です。

7. 文献

- [1] Matsuda, H. and Murata, M. Sixth Int Congress of Virology, Sendai (1984)
- [2] Nishinaka, S. et al. Int Arch Allergy Appl Immunol, 89, 416 (1989)
- [3] Nishinaka, S. et al. J Immunol Methods, 139, 217 (1991)
- [4] Nishinaka, S. et al. J Vet Med Sci, 58, 1053 (1996)
- [5] Asaoka, H. et al. Immunol Lett, 32, 91 (1992)
- [6] Asaoka, H. et al. J Vet Med Sci, 56, 375 (1994)
- [7] Lillehoj, HS et al. Poult Sci, 74, 1685 (1994)
- [8] Sasai, K. et al. J Parasitol, 82, 82 (1996)
- [9] Matsuda, H. et al. FEMS Immunol Med Microbiol, 23, 189 (1999)
- [10] Nakamura, N. et al. Cytotechnol, 31, 191 (2000)
- [11] Nakamura, N. et al. J Vet Med Sci, 66, 807 (2004)
- [12] Davies, ED. et al. J Immunol Methods, 186, 125 (1995)
- [13] Yamanaka, HI. et al. J Immunol, 117, 1218 (1995)
- [14] Nakamura, N. et al. J Immunol Methods, 280, 157 (2003)
- [15] Nishibori, N. et al. Biologicals (2004) (in press)
- [16] Michael, N. et al. Proc Natl Acad USA, 95, 1166 (1998)