

総 説

抗体エンジニアリング
Antibody engineering

粕谷和彦 土田明彦 青木達哉
Kazuhiko KASUYA, Akihiko TSUCHIDA, Tatsuya AOKI

東京医科大学外科学第三講座
Third Department of Surgery, Tokyo Medical University

はじめに

1975年 Köhler と Milstein は、英国の科学雑誌 Nature に、細胞融合の技術を用いてモノクローナル抗体を *in vitro* で産生する方法を報告した¹⁾。今日の抗体療法が飛躍的に発展したのは、彼らの画期的な方法の開発に端を発しており、その功績に対しノーベル賞が授与された。細胞融合法とは、細胞をポリエチレングリコールで処理することで細胞同士の膜を融合させ雑種細胞 (ハイブリッド) にすることである。融合細胞では同時に核も融合して4倍体になり、染色体数は徐々に減少し安定化しハイブリドーマと呼ばれる細胞になる。マウスのBリンパ球と骨髄腫細胞を融合させると抗体を産生し続けるハイブリドーマができ、大量のモノクローナル抗体 (Fig. 1A) を *in vitro* で産生することができる。モノクローナル抗体は、特定の抗原決定基 (epitope) に対する特異的な抗体であり、血液細胞をはじめとする細胞抗原診断、種々の微量分子定量や精製などを可能にし、この方法は医学に膨大な恩恵をもたらした。

このマウスモノクローナル抗体は、開発当初より抗体療法としての期待を担ってきた。しかし、マウスで作成された抗体はヒトにとって異物であり、生体内に投与された抗体は速やかに体内から排除される。その

最大の理由は、投与された患者の約半数に抗マウスモノクローナル抗体 (human anti-mouse antibody: HAMA) が出現したためである。また、アナフィラキシー誘発の危険性もあり、同一固体内への複数回投与は困難であった。このように、ヒトへの抗原性のためにマウスモノクローナル抗体の臨床応用はきわめて限られたものとなった。その後の研究は HAMA による障害を乗り越えるべく、ヒト型のアミノ酸配列をもつヒトモノクローナル抗体作成に向けて膨大な研究が行われたが、研究開発は難渋し臨床医薬への実用化は停滞した。その後30年を経て、抗体作成の技術革新により新たな抗体医薬が臨床の場に姿を見せ始めた。臨床試験段階にある新薬も多く、その方法や用途も多様性に富む。本稿ではヒト化を中心とした抗体エンジニアリングとその応用を紹介する。

ヒト化抗体のエンジニアリング

1980年代後半からの抗体工学は HAMA の克服であった。まず、マウスのモノクローナル抗体の可変領域とヒトの定常領域を融合させた抗体 (ヒト・マウスキメラ抗体) が作成された (Fig. 1B)。キメラ抗体では全領域の70%がヒト由来となるため、マウスモノクローナル抗体に比して抗原性を著しく減弱できるため、HAMA の出現を5%以下に減少させることができ

2006年2月16日受付、2006年2月27日受理

キーワード: 抗体エンジニアリング、抗体医薬、能動免疫、融合抗体

(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1 東京医科大学外科学第三講座 粕谷和彦)

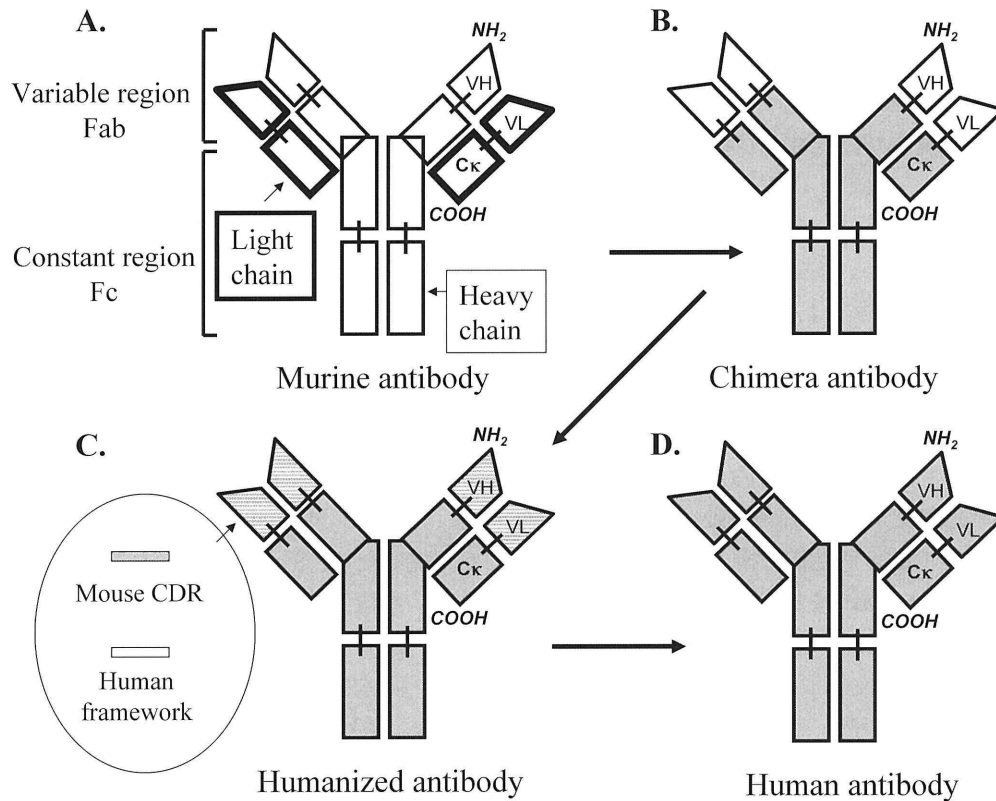


Fig. 1 Illustrations of various modifications to monoclonal antibodies: Murine monoclonal antibodies (A). Chimeric antibody with human Fv fragments containing some human constant region sequences along with the mouse V region (B). Humanized antibodies with mouse CDR and human FWR based on chimeric antibodies (C). Human antibodies (D).

た。同時に、ヒト型定常領域は補体依存性細胞障害活性 (complement dependent cytotoxicity: CDC) や抗体依存性細胞障害活性 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) を誘導できるため、殺腫瘍効果を期待できる。その先陣をきったのがキメラ抗体抗 CD20 抗体である rituximab (商品名: リツキササン。対象疾患: 低悪性度または濾胞性非ホジキン・マンツル細胞リンパ腫。1997年に本邦認可) である。rituximab は、ヒト IgG1 κ の定常部と IgG1 型マウス抗 CD20 抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子 construct を Chinese hamster ovary cell に導入することで量産された²⁾。異種抗体が産生されにくいことがキメラ抗体の第一の利点であるが、血中半減期が長いという利点もある。定常部をヒト化することによって、ヒト CDC や ADCC effector cell の活性化効率が約 1,000 倍に増強される。米国での第 I 相試験では²⁾、15 例の再発・再燃 B 細胞リンパ腫患者に段階的増量 (10, 50, 100, 250, 500 mg/m²) による単回投与を行い、6 例で腫瘍縮小効果を認めた。また、発熱・悪心・起立性低血圧などの薬物有害反応 (adverse drug reaction: ADR) が認められたが、いずれも grade 2 以下で血液毒性は軽微で

あった。その後、第 I 相試験にて安全性が確認された 375 mg/m²、週 1 回、4 週投与による第 II 相試験が行われ³⁾、37 例中 3 例 (9%) で完全奏効 (complete response: CR) 14 例 (41%) で部分奏効 (partial response: PR) が得られた。さらに、未治療例を主体とした低悪性度 B 細胞リンパ腫に対して、CHOP 療法と rituximab の併用による第 II 相試験が行われ、CHOP 療法単独に対し優れた治療成績が得られるとともに、毒性の有意な増強は認められなかった⁴⁾。本邦でも第 I 相、第 II 相試験が施行され、一定の治療効果が報告された⁵⁾⁶⁾。これらの結果より、rituximab は血液毒性が低く、他の抗癌剤との併用が可能ながその利点として挙げられる。

一方、キメラ抗体においてもマウス可変領域の抗原性は残るため、抗原との結合領域に対して抗イデオタイプ抗体が出現し、キメラ抗体の活性を阻害する可能性が指摘された。そこで、ヒト化抗体が開発された (Fig. 1C)。つまり、マウス抗体の可変領域の抗原相補性決定領域 (complementarity-determining region: CDR) と呼ばれる抗原と直接結合する領域のみを残し、可変領域のフレームワーク領域 (Framework

region: FWR) と定常部をヒト化した抗体である (CDR グラフト技術)。このようにして作成された抗 HER2 抗体 trastuzumab (商品名: ハーセプチン。対象疾患: HER2 過剰発現が確認された転移性乳癌。1998 年に本邦認可⁷⁾) は、構成アミノ酸の 95% がヒト IgG 由来、5% のみがマウス抗体 4D5 由来であるため、ヒトへの抗原性が極めて低い。また抗原親和性と特異性は親抗体である 4D5 と同等であり、ADCC 誘導能を保持していた。Trastuzumab の有用性が決定的になったのは、再発後の初回治療としての細胞毒性化学療法に trastuzumab 併用あり・なしのランダム化比較試験 (第 III 相試験) で有益な結果がもたらされたことによる⁸⁾。その中で初回投与時に trastuzumab を併用しなかった化学療法群では、病期進行後 (progressive disease: PD) に trastuzumab を投与しても生存期間の延長を得なかった。つまり、HER2 過剰発現の再発性乳癌では trastuzumab 投与は必須であるということが明らかになった。その後、結腸癌・直腸癌を対象として、抗 VEGF 抗体 (bevacizumab, 商品名: Avastin) や抗 EGF-R 抗体である cetuximab (商品名: Erbitux) などが開発され、現在臨床試験の段階にある。

ファージディスプレイライブラリー法

1985 年に Smith らが⁹⁾、ファージディスプレイライブラリーの作成を、また、1991 年と 1994 年に Winter らが¹⁰⁾¹¹⁾、ファージディスプレイ法によるヒト化抗体を開発したことによって、全くマウスのアミノ酸配列をなくした抗体の作成が可能となった。ファージディスプレイ技術の特徴は、任意のタンパク質やペプチドを、他の分子と相互作用しうような状態でファージの表面に提示できること、しかも、その提示された分子のシーケンス情報がそのファージクロンの DNA の中に組み込まれているということである。また、ファージ自身、一度に大量のクローンを扱うことが可能なため、種々のタンパク質やペプチドをコードしている遺伝子を組み込むことで、 $10^8 \sim 10^{12}$ 程度のタンパク質・ペプチドライブラリーを構築することができる。具体的には、正常なヒト B リンパ球よりヒト抗体重鎖、軽鎖 mRNA を RT-PCR で増幅するとともに、CDR3 領域に人工的配列を加えたもの (ファージライブラリー) から、高親和性のヒト可変領域を発現するクローンを選択する (ファージディスプレイ法) ものである (Fig. 2)。これにより、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

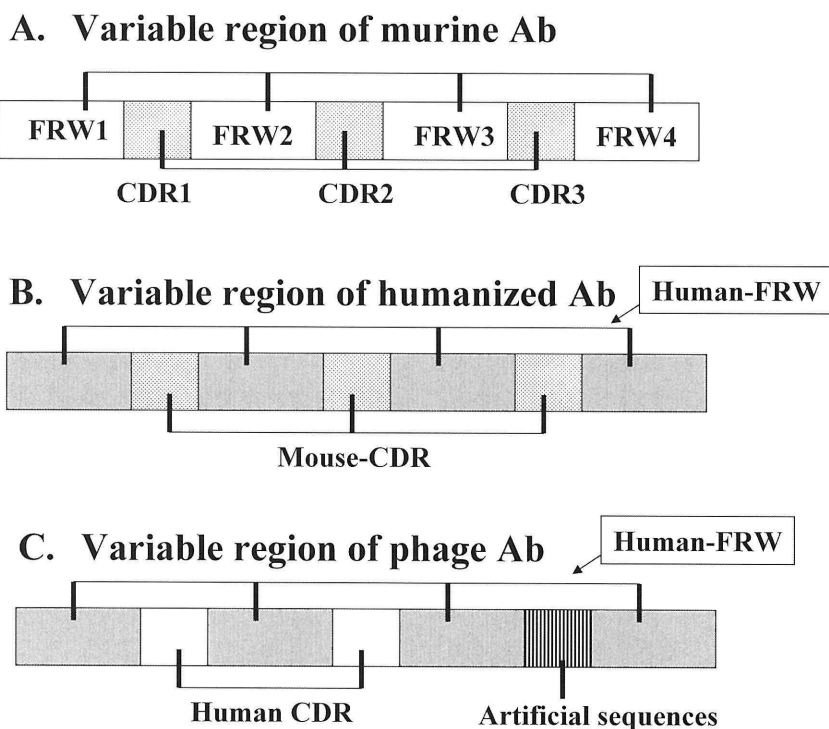


Fig. 2 Various modifications of variable regions of antibodies: Mouse monoclonal antibodies have three CDRs and four frame works (FRWs) (A). Variable regions of humanized antibodies have mouse CDRs and human FRWs (B). Variable regions of phage antibodies contain full human CDR1 and 2 with some mutations and artificial sequences in CDR3 (C).

産生系を模倣し、かつ抗原の種類を選ばない優れたシステムとして、ヒト自己成分を含む多種類の抗原に対する完全ヒト型抗体作成への新たな道を開き、抗体医薬開発に大きな影響を与えている。

TNF- α は多くの炎症反応に関与するサイトカインカスケードであり、慢性関節リウマチ (RA) を引き起こす炎症性サイトカインの上流に位置すると考えられている。そこで、過剰に産生されている TNF- α を中和することにより炎症組織を正常化する試みが行われている。なかでも、tumor necrosis factor (TNF) - α に対する抗体 infliximab (cA2) (商品名：レミケード) は、2001年に米国で RA 患者への臨床試験が行われ一定の効果が得られたが¹²⁾、キメラ抗体であるためヒト化抗体に対するヒト抗体 (human anti-human antibody: HAHA) が出現している。delete 抗体の特異性は可変領域遺伝子の再構成と突然変異によって生み出されるため、常に非自己として認識される可能性を秘めている (Jerne, NK の Network Theory¹³⁾)。つまり、「ヒト抗体だから、それに対する抗体は産生されない」とはならない。ヒト抗体は他の抗体に比し、極めて免疫原性 (抗原性) が低いものと理解する必要がある。これを克服するために、現在では、ファージディスプレイ法により得られた完全ヒト化抗体 (single chain fragment variant: scFv) である D2E7 が作成され、RA に対する臨床試験が行われている。

治療効果をあげるエンジニアリング

近年、抗体医療はようやく一つの医薬分野としての地位を築きつつある。現在は他のテクノロジーと組み

合わせるにより、抗体の新たな使用法を模索している段階である。医薬品としての焦点は「いかにして治療効果を上げるか。」ということに尽きる。

2001年の秋、米国で起きた炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) テロ事件で、肺炭疽により5人の犠牲者が出た。彼らは抗生物質による集中治療にも関わらず死亡した。炭疽菌は浮腫因子、致死因子、防御抗原の3種類の毒素を産生し、感染者を死に至らしめる。まず、防御因子が標的細胞に結合し、致死因子と浮腫因子を細胞内に入れるためのゲートを作り出す。細胞内に入り込んだ浮腫因子は細胞の機能低下を起こさせ、致死因子は細胞を死に至らしめる。防御抗原はいうなれば細胞膜を貫通させる強力なドリルと注射筒のようなものである。現在の米軍の使用ワクチンは炭疽菌の菌体を含まない防御抗原のみをワクチンとして用いている。しかしながら、ワクチン投与は18ヶ月、6回に及び、急激な感染に対応できない¹⁴⁾。

筆者らは防御抗原に対する抗体の可変領域 (重鎖と軽鎖をGSリンカー (GGGS) 3のペプチドでつないだものとヒト Ig κ の定常領域を結合したもの (単鎖抗体: single-chain antibody: scab) を5型ヒトアデノウイルス (E1-, E3-) に組み込んだベクターを構築した (Fig. 3)。可変領域はファージディスプレイの技術により最も抗原との結合性が高く、また血中での安定性が高く、かつ防御抗原の中和活性が高いものを用いた¹⁵⁾。可変領域は分子量が小さく (約45 kDa) 組織浸透性は高いが、反面血中での半減期が短い。しかしながら、アデノウイルスによる高発現が半減期の短さを短縮するものと考えた。その結果、ベクターにより

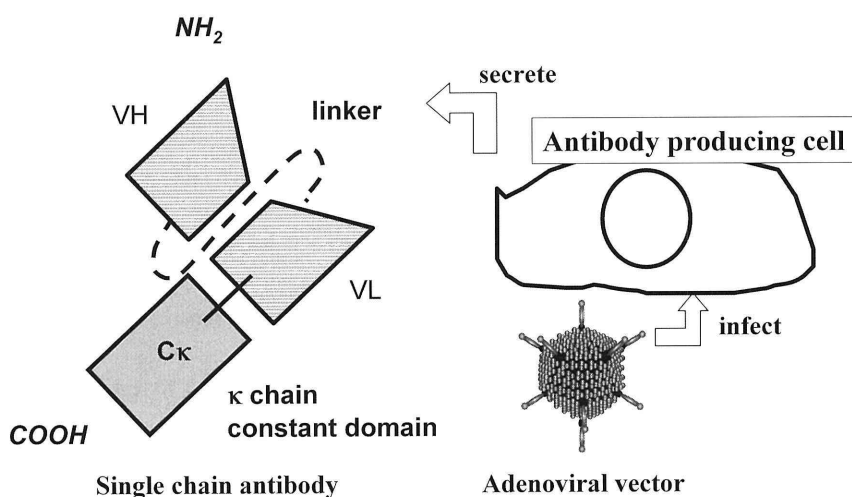


Fig. 3 Single chain antibodies produced by recombinant technology. They were secreted from cells infected by adenovirus vector.

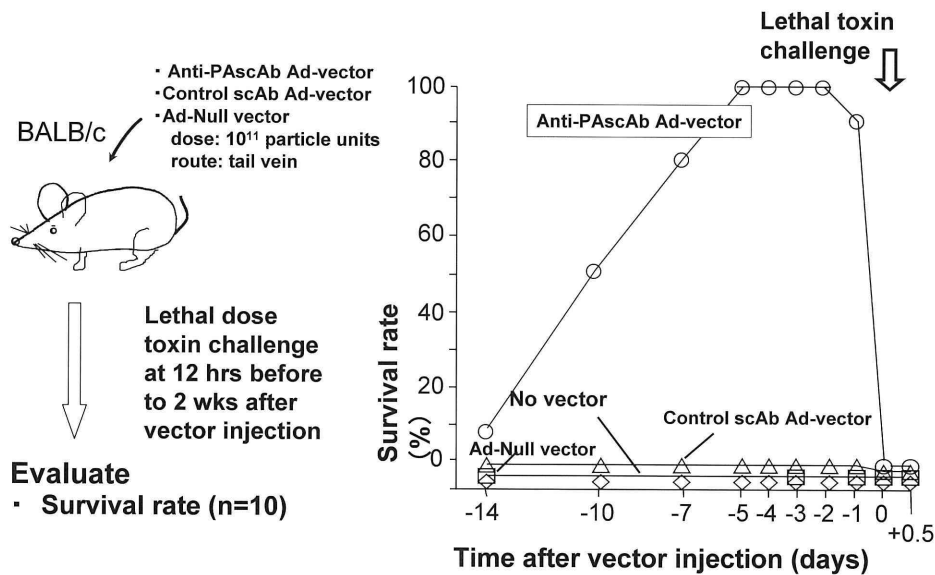


Fig. 4 Following adenovirus anti-PAscAb administration to mice, anti-PA single chain antibody and anti-PA neutralizing activity were detected in serum over a 2-week period. Substantial survival advantage from anthrax lethal toxin was conferred by the Ad-anti-PAscAb (open circle) following administration from 1 to 14 days prior toxin challenge.

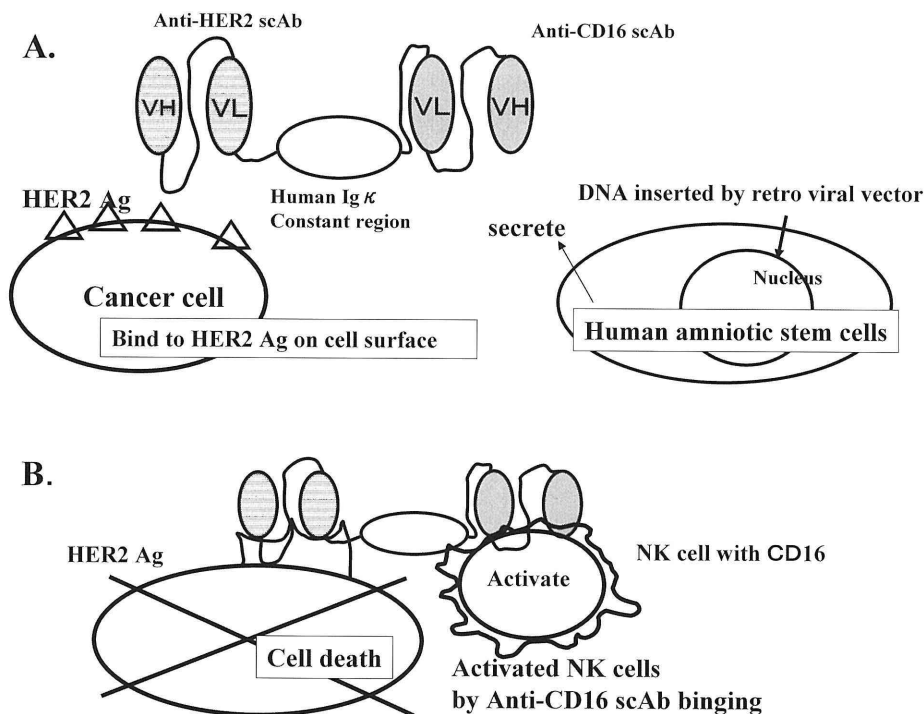


Fig. 5 Bispecific antibodies using the human anti-HER2 scFv (C6.5) and the human CD16 scFv component (NM3E2). The NM3E2 scFv retains binding CD16 in the presence of plasma IgG. The human origin of C6.5×NM3E2 bs-scFv avoids the HAMA responses that were one of the obstacles encountered in the clinical trials performed with the 2B1 bsAb(A). The bsAb induced NK cell activation and highly selective HER2 expressing tumor targeting (B).

産生された単鎖抗体は、投与1日目から14日目まで、マウスの致死試験においてマウスを生存させた (Fig. 4)。このように多量の中和抗体を投与する方法として、特別な担体、carrier (この場合はアデノウイルス) を用いることも抗体の効果を上げる方法である¹⁶⁾。

抗体医療において抗体が機能するためには、エフェクター機能 (ADCCとCDC) が重要である。エフェクター機能とは、抗体のFc領域が担い、抗体のクラスに依存する。抗腫瘍効果においては、特にADCCがキーとなる。delete IgGクラス抗体がT細胞、NK細胞

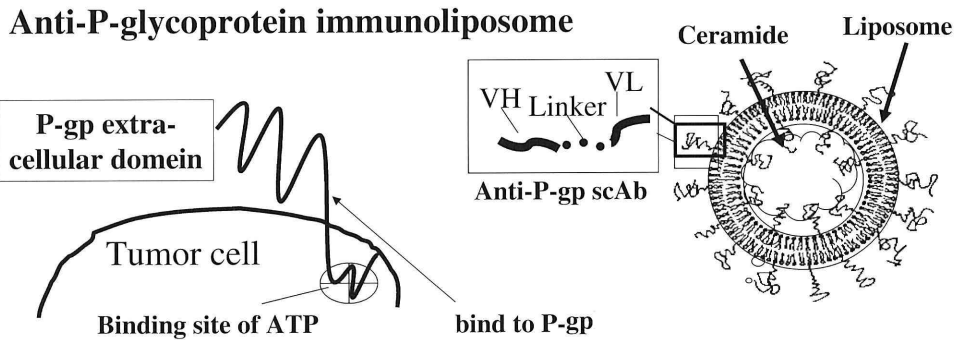


Fig. 6 Schematic illustrations of a selective transfer model proposed for ceramide from anti-P-gp immunoliposome to the P-gp expressing membrane of the tumor cells. The immunoliposome binds to the extradomain of P-gp and internalized by constitutive endocytic processes.

胞、好中球、マクロファージ上の Fc 受容体を介して、これらのエフェクター細胞を活性化し、抗体の結合した標的細胞（腫瘍細胞）を殺す効果を持つ（特に NK 細胞）。日本でも販売されているハーセプチンやリツキサンも ADCC を介して機能していると考えられている⁹⁾。また抗体自身に修飾を加え、治療効果を高めようとする試みも始まっている。抗体のもつエフェクター機能を高めるため、T 細胞、NK 細胞、好中球、マクロファージを活性化するサイトカイン（IL-2, IL-12, GM-CSF, TNF, RANTES）との融合抗体が研究され、一部で臨床試験が始まっている¹⁷⁾。

現在、筆者らは抗 HER2 抗体と抗 CD16 活性化抗体の可変領域の融合抗体を用いた細胞療法を進めている。ヒト抗体遺伝子の大きさは 1-2 Mb と巨大であり、ヒト IgG 抗体の定常領域を遺伝子クローニングすることが困難であることから、Fc 機能の代用として抗 CD16 活性化抗体の可変領域を採用した¹⁸⁾¹⁹⁾。レトロウイルスベクターとして同遺伝子を治療用細胞に導入しており、抗体を発現する細胞移植療法への応用を目指している（Fig. 5）。

1990 年代初頭、Vietta E らによりすすめられた癌のミサイル療法にも抗体が用いられた²⁰⁾²¹⁾。モノクローナル抗体に抗癌剤や毒素などを結合させ、抗癌効果を癌に限局する drug delivery system (DDS) の方法である。その一つとして、Torchilin らは、標的細胞（分子）に対する抗体をリポゾームに結合して標的指向性をもたせたイムノリポゾームを提唱した²²⁾。Hosokawa, Tagawa らは、胃癌、大腸癌に特異性の高い L-glutamic acid gamma-monohydroxamate (GAH) をリポゾームの表面に配し、リポゾームの中にドキソルビシンを封入したリポゾーム MCC-465 を作成し、世界初の臨床開発にむけて製剤化を検討している²¹⁾。1999

年から 2001 年に行われた第 I 相試験では、ヒト化抗体の臨床試験においてしばしば観察される HAHA 反応は全く検出されておらず、さらにドキソルビシン封入リポゾームで報告されている心血管系の副作用や手掌・足底発赤症候群の発現も認めなかった²³⁾²⁴⁾。現在、筆者らもアポトーシス誘導作用のあるスフィンゴ脂質であるセラミドを封入したリポゾームの表面に、抗 P 糖タンパクの細胞膜外ドメインに対する単鎖抗体である抗 P 糖タンパク-イムノリポゾームを作成し、その組織特異性を検討中である（Fig. 6）。

おわりに

抗体エンジニアリングは抗体医薬を視野に入れ、バイオチップや細胞ディスプレイ系による変異体抗体、ヒト抗体生産トランスジェニックマウス、アプタマーなど話題に尽きない。現在承認されている分子標的薬（治療用抗体）はすべて抗体エンジニアリングの成果である。今後も新規の薬剤の承認は続くであろう。臨床の医師・医療研究者としては、目的に応じた抗体を見つけて臨床への応用を考えることが大切である。また、安全性や経済性の高い開発法や投与法を模索することも抗体エンジニアリングの一つとして重要と考えられる。

文 献

- 1) Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975
- 2) Maloney DG, Lines TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, Levy R: Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell

- lymphoma. *Blood* **84** : 2457-2466, 1994
- 3) McLaughlin P, Liles, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK : Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma : half of patients responded to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* **16** : 2825-2833, 1998
 - 4) Vose JM, Link BK, Grossbard ML, Czuczman M, Grillo-Lopez A, Gliman P, Lowe A, Kunkel LA, Fisher RI : Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* **19** : 389-397, 2001
 - 5) Tobinai K, Kobayashi Y, Narabayashi M, Ogura M, Kagami Y, Morishima Y, Ohtsu T, Igarashi T, Sasaki Y, Kinoshita T, Murate T : Feasibility and pharmacokinetic study of a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in relapsed B-cell lymphoma. *Ann Oncol* **9** : 527-534, 1998
 - 6) Tobinai K : Clinical trial of a mouse-human chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) for B-cell lymphoma in Japan. *Cancer Chemother Pharmacol* **98** (Suppl 1) : S85-S90, 2001
 - 7) Park JW, Stagg R, Lewis GD, Carter P, Maneval D, Slamon DJ, Jaffe H, Shepard HM : Anti-p185HER2 monoclonal antibodies : biological properties and potential for immunotherapy. *Cancer Treat Res* **61** : 193-211, 1992
 - 8) Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H : Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* **99** : 754-758, 2002
 - 9) Smith GP : Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228** : 1315-1317, 1985
 - 10) Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G : By-passing immunization human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* **222** : 581-597, 1991
 - 11) Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR : *Ann Rev Immunol* **12** : 433-455, 1994
 - 12) Glover RD : 12th Annual International Conference on Antibody Engineering 2001, (San Diego)
 - 13) Jerne NK : Clonal selection in a lymphocyte network. *Soc Gen Physiol Ser* **29** : 39-48, 1974
 - 14) <http://www.anthrax.osd.mil/vaccine/schedule.asp>
 - 15) Manard JA, Maassen CB, Leppla SH, Brasky K, Patterson JL, Iverson BL, Georgiou G : Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat. Biotechnol* **20** : 597-601, 2002
 - 16) Kasuya K, Boyer JL, Tan Y, Alipui DO, Hackett NR, Crystal RG : Passive immunotherapy for anthrax toxin mediated by an adenovirus expressing an anti-protective antigen single chain antibody. *Mol Ther* **11** : 237-244, 2005
 - 17) Chadd HE, Chamow SM : Therapeutic antibody expression therapy. *Curr Opin Biotechnol* **12** : 188-194, 2001
 - 18) Weiner LM, Clark JI, Ring DB, Alpaugh RK : Clinical development of 2B1 a bispecific murine monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and FcγRIII. *J Hematother* **4** : 453-456, 1995
 - 19) McCall AM, Adams GP, Amoroso AR, Nielsen UB, Zhang L, Horak E, Simmons H, Schier R, Marks JD, Weiner LM. Isolation and characterization of an anti-CD16 single chain-Fv fragment and construction of an anti-HER2/neu/anti-CD16 bispecific scFv that triggers CD16-dependent tumor cytotoxicity. *Mol Immunol* **36** : 433-446, 1999
 - 20) Vitetta ES : The development of immunotoxins for the therapy of cancer, AIDS, and immune dysfunction. *Princess Takamatsu Symp* **19** : 333-340, 1988
 - 21) Vitetta ES : Immunotoxins : new therapeutic reagents for autoimmunity, cancer, and AIDS. *J Clin Immunol* **10** (6 Suppl) : 15S-18S, 1990
 - 22) Torchilin VP, Klivanov AL, Huang L, O'Donnell S, Nossiff ND, Khaw BA : Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium. *FASEB J* **6** : 2716-2719, 1992
 - 23) Hosokawa S, Tagawa T, Niki H, Hirakawa Y, Nohga K, Nagaike K : Efficacy of immunoliposome on cancer models in a cell-surface-antigen-density-dependent manner. *Br J Cancer* **89** : 1543-1551, 2003
 - 24) Uziely B, Jeffers S, Isacson R, Kutsch K, Wei-Tsao D, Yehoshua Z, Libson E, Muggia FM, Gabizon A : Liposomal doxorubicin : antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. *J Clin Oncol* **13** : 1777-1785, 1995