

3. CBIS 法による高感度抗体の作製

鈴木裕之, 金子美華, 加藤幸成

抗体医薬はがん、免疫疾患などの治療に革命をもたらしてきた。抗体は標的抗原に特異的に結合し、リガンド・受容体結合の中和、さらにはがん細胞に対する抗体依存性細胞傷害を促進することで抗腫瘍効果を発揮する。また抗体薬物複合体では、腫瘍細胞特異的に薬物を送達することが可能となり、より多くのがんへ適用されている。さらに抗体可変部情報は、二重特異性抗体などのさまざまな抗体形式や、キメラ型抗原受容体発現T細胞にも用いられている。このような抗体医薬の開発には、特異性、感度に優れた抗体の開発が必須である。本稿ではわれわれが行っている細胞基盤選択法（CBIS法）による抗体樹立について紹介する。

はじめに

モノクローナル抗体の樹立法は、ケーラーとミルシュタインによって開発されたハイブリドーマ^{*1} 産生技術によって確立され、ウインターによって開拓されたヒト化抗体技術（第3章-7）は、治療用抗体開発に貢献してきた。現在までに100を超える抗体医薬が、がん、自己免疫疾患、慢性炎症性疾患、コロナウイルスによる重症急性呼吸器症候群など、さまざまな疾患の治療薬として米国食品医薬品局（FDA）で承認されている。**図1**は固形腫瘍に対する抗体医薬の標的を示している。

世界ではじめて乳がん治療で承認された抗HER2抗体 Trastuzumab は、標的に結合すると抗体依存性細胞傷害（ADCC）、補体依存性細胞傷害（CDC）、抗体依存性細胞食作用などの免疫応答を促進することで抗腫瘍効果を発揮する。また抗EGFR抗体Cetuximabは、主にリガンド・受容体結合の中和作用により、抗腫瘍効果を発揮する¹⁾。抗体薬物複合体^{*2}（ADC）は、抗原発現細胞特異的に薬物を送達することで抗腫瘍効果を発揮し、多くの標的、がん種への適用に貢献している²⁾。Trastuzumabの適用はこれまでHER2高発現のがんに限られていたが、そのADCである Trastuzumab

【略語】

ADC : antibody-drug conjugate (抗体薬物複合体)

ADCC : antibody-dependent cellular cytotoxicity (抗体依存性細胞傷害)

CAR-T : chimeric antigen receptor-T cell (キメラ型抗原受容体発現T細胞)

CasMab : cancer-specific mAb (がん特異的抗体)

CBIS : cell-based immunization and screening (細胞基盤選択法)

CDC : complement-dependent cytotoxicity (補体依存性細胞傷害)

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

Development of highly sensitive monoclonal antibodies by CBIS method

Hiroyuki Suzuki/Mika K Kaneko/Yukinari Kato : Department of Antibody Drug Development, Tohoku University Graduate School of Medicine (東北大学大学院医学系研究科抗体創薬学)

抗体単独療法

抗体薬物複合体

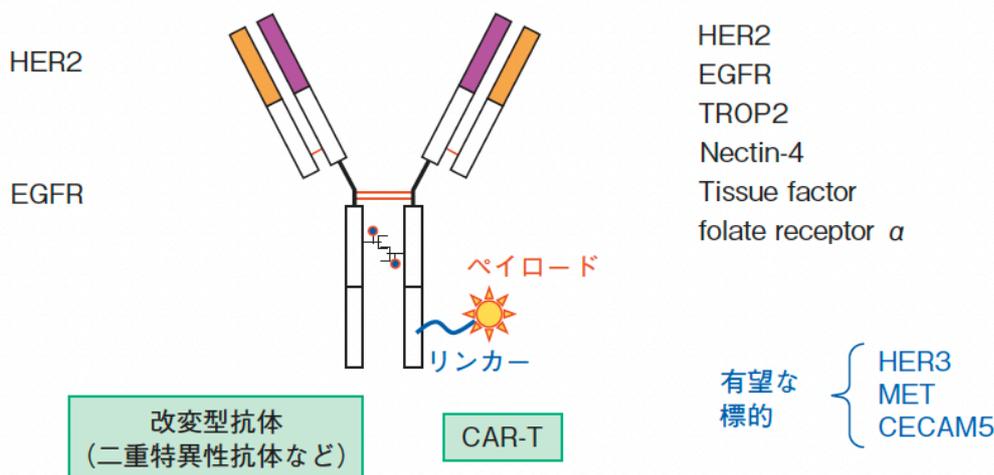


図1 固形腫瘍への抗体療法の標的抗原

固形腫瘍に対して承認されている抗体医薬の標的を黒色で示している。これら抗体医薬は抗体単独，または抗体薬物複合体（ADC）として臨床で使用されている。ADCの臨床開発では，HER2，EGFRに加えて4種類（TROP2，Nectin-4，Tissue factor，folate receptor α ）の標的に対するADCが承認されている。また今後有望な標的3種類（HER3，MET，CECAM5）に対するADCの開発が進められている²⁾。さらに抗体可変部の情報はCAR-Tや改変型抗体として臨床開発されている。

deruxtecanではHER2低発現のがんでも有効性が確認され，乳がんをはじめとするHER2陽性がん治療への貢献が期待されている³⁾。一方で固形腫瘍に対する標的は十分とはいえず，標的の枯渇も問題になっている。

抗体可変部の情報は，低分子抗体，二重特異性抗体などのさまざまな改変型抗体⁴⁾やキメラ型抗原受容体発現T細胞（CAR-T）⁵⁾にも用いられ，臨床試験も数多く進められている。また抗体は各種疾患のコンパニオン診断薬（治療薬が患者に有効かを調べるために，治療薬の効果に関連する特定の遺伝子やタンパク質発現の検査に使う薬のこと），血中マーカーの検出，血液循環腫瘍細胞の捕捉にも臨床応用されている。

このような抗体医薬の開発には，特異性，感度に優

れた抗体の開発が必須である。本稿ではわれわれが行っている細胞基盤選択法（cell-based immunization and screening：CBIS法）についてその実施例（抗CD44抗体樹立）とともに紹介する。

1 CBIS法の実例

通常の抗体作製には，合成ペプチドや精製タンパク質が免疫原として用いられるが，CBIS法では抗原を過剰発現させた細胞を用いる。そのため精製困難な細胞膜タンパク質でも細胞株を樹立できれば免疫原にすることができる。図2ではCD44v3-10を過剰発現させたCHO-K1（CHO/CD44v3-10）を用いて，さまざまなエピトープを認識する抗体を樹立した過程を示す。

1) CHO/CD44v3-10の樹立と免疫

抗原発現細胞にCHO-K1を用い，CD44v3-10遺伝子を導入後，CD44v3-10を高発現するCHO/CD44v3-10細胞を樹立した。免疫は通常BALB/cマウス（2匹）に， 1×10^8 個の細胞を5回投与することで行っている。

2) ハイブリドーマの作製

最終免疫の2日後に脾細胞を調製し，ポリエチレングリコールを用いてマウスミエロマP3U1細胞と細胞融合を行う。融合した細胞は96 well plate（10枚）

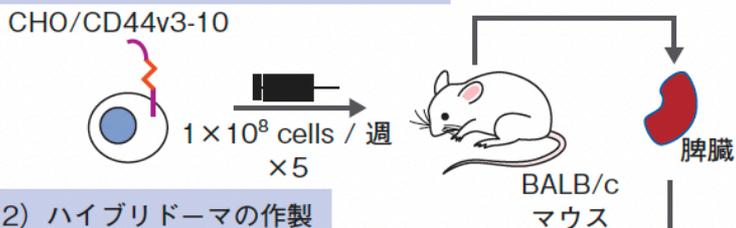
※1 ハイブリドーマ

抗体産生細胞と無限の増殖能をもつミエロマ細胞を融合させて作製される。これにより抗体産生細胞がつくる抗体を高い純度で，大量に入手することが可能になった。

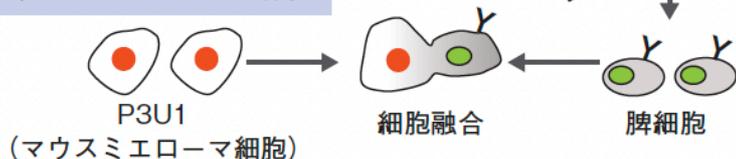
※2 抗体薬物複合体

antibody-drug conjugate, ADC. 抗体分子に強い細胞毒性を有する抗がん剤（ペイロード）をリンカー配列を介して結合させたもの。標的抗原に結合すると，エンドサイトーシスを介して内在化され，細胞内酵素によってリンカー配列が切断されて抗がん剤が細胞内に放出され抗腫瘍活性を発揮する。

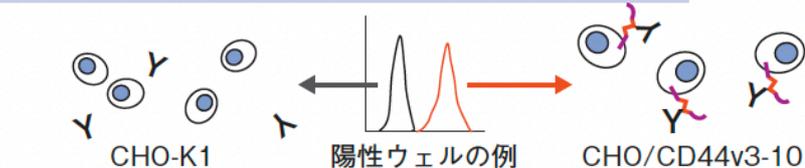
1) CHO/CD44v3-10 の樹立と免疫



2) ハイブリドーマの作製



3) 培養上清のスクリーニング (フローサイトメトリー)



4) ハイブリドーマの限界希釈 & エピトープの決定

5) 各種アプリケーションへの適用

6) 抗体遺伝子のクローニング, リコンビナント抗体の生産

高速フローサイトメトリー
(SA3800 Cell Analyzers)



フローサイト
メトリー

免疫組織染色

ウェスタン
ブロット

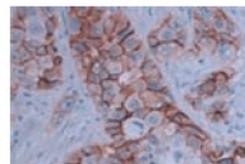
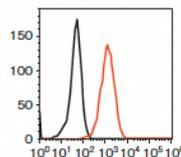


図2 CBIS法を用いた抗CD44抗体の樹立とその利用

でHATセレクションを開始する。核酸合成のサルベージ回路を欠くミエローマ細胞は、HAT培地中のアミノプテリンにより *de novo* 回路の核酸合成を阻害され死滅する。一方、脾細胞は *in vitro* では短時間しか生育できず、融合細胞のみが脾細胞のサルベージ回路を用いることでHAT培地でも増殖できる。

3) フローサイトメトリーによる培養上清のスクリーニング

1週間で、1 wellあたり多数のハイブリドーマ由来のコロニーが認められるようになる。これらの培養上清を用い、フローサイトメトリーで親株CHO-K1よりもCHO/CD44v3-10細胞に高い反応性を示す培養上清をスクリーニングする。このため1日のスクリーニングで20枚の96 well plateのデータを取得する必要があり、われわれは高速フローサイトメーターを用いることでこのスクリーニングを可能にしている。

4) ハイブリドーマの限界希釈, エピトープの決定

陽性ウェルは直ちに限界希釈を開始し、ハイブリドーマのクローン化を行う。クローン化されたwellに対し、3)のスクリーニングをくり返し、抗CD44v3-10抗体のクローンを得た。得られたクローンの培養上清を用

いて、エピトープ^{※3}解析により認識部位を決定した。これらの免疫-スクリーニングを数回実施し、約100個のクローンを樹立している。

5) 各種アプリケーションへの検討

フローサイトメトリーだけでなく、他のアプリケーション(免疫組織染色, ウェスタンブロット)にも適用可能かどうか検討を進めた。

6) 抗体遺伝子のクローニング

得られたクローンの抗体産生能は個々のクローンごとに異なり、時には抗体の産生が減少したり、停止することもある。有用な抗体の産生クローンからは直ちに抗体遺伝子のクローニングに進む。研究用途によって、クラススイッチ^{※4}, キメラ化, ヒト化抗体^{※5}に改変, 生産することができる。現在の技術ではmg単位のリコンビナント抗体の生産が可能であり、これらは主に動物実験に使用している。

※3 エピトープ

標的抗原内の抗体が結合する部位のこと。抗原内のアミノ酸やそれに付加する糖鎖修飾などを認識する場合もある。同じ標的を認識する抗体でもエピトープが異なることによってその生物活性が変化する場合もある。

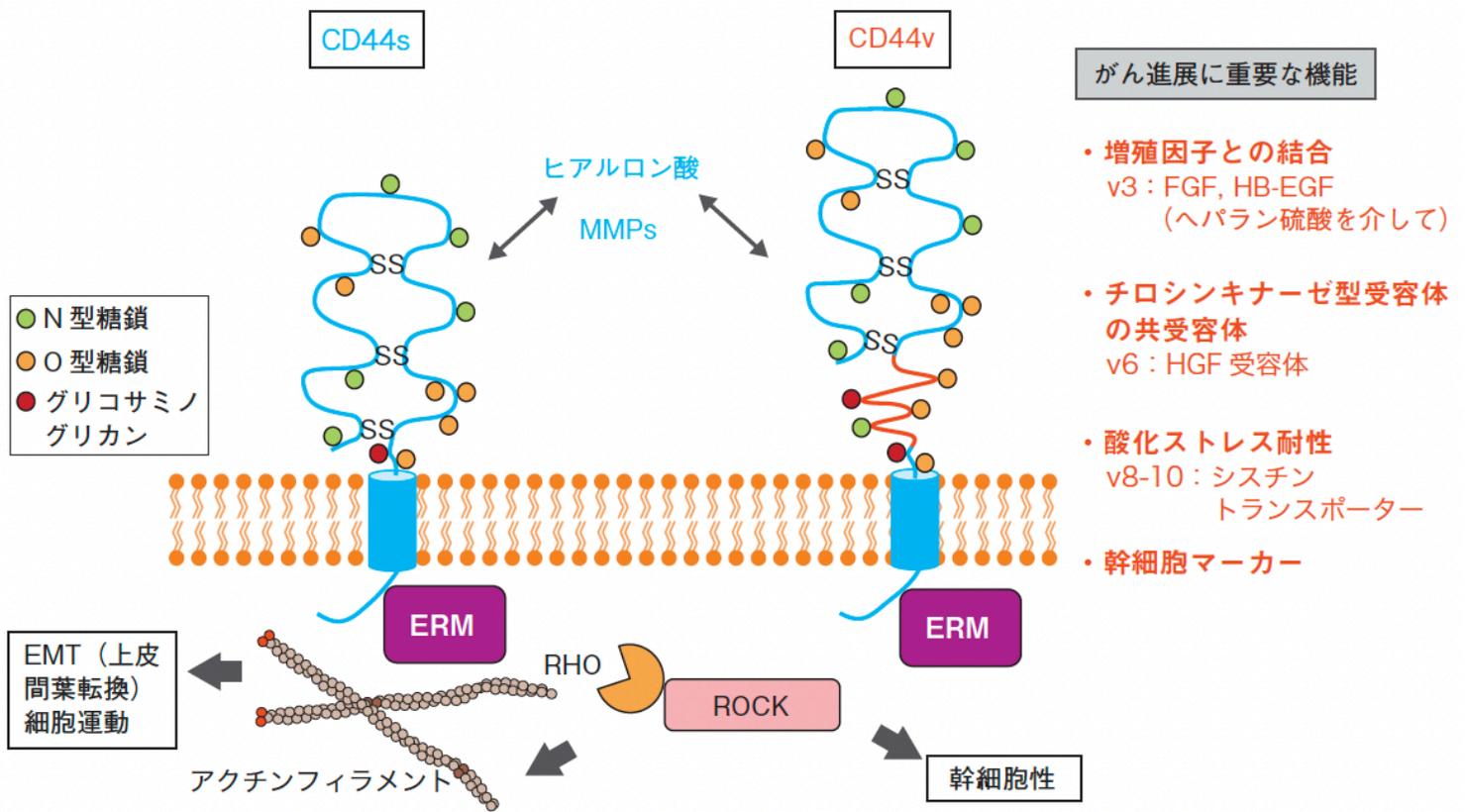


図3 CD44の機能

CD44には大きく分けてCD44s (左) とCD44v (右) が存在し、さらにCD44vは選択的スプライシングにより多数のアイソフォームが存在する。CD44sとCD44vに共通する細胞外領域 (水色) はヒアルロン酸やMMP (マトリクスメタロプロテアーゼ) と結合し、腫瘍微小環境との相互作用や浸潤を促進する。CD44vは独自の細胞外ドメイン (赤色) をもち、個々のバリエーション領域で異なる機能を有し、がんの増殖、浸潤、転移、酸化ストレス耐性、幹細胞性獲得に重要な役割を果たす。細胞内領域はERMタンパク質を介してRHO活性を制御し、アクチン再構成やROCKシグナル伝達を活性化する。

2 抗CD44抗体

CD44は1回膜貫通型糖タンパク質で、ヒアルロン酸を含む細胞外マトリクスに結合するなど、その機能は多岐にわたる (図3)。CD44は多数のエクソンから構成され、そのうちの10個はすべてのアイソフォームに存在し、これらで構成されるCD44はCD44標準型

(CD44s) とよばれる。一方CD44バリエーション (CD44v) は、選択的スプライシングによって、バリエーションエクソンがさまざまな組み合わせでCD44標準型に挿入される。CD44アイソフォームには、重複する役割と独自の役割があり、CD44sとCD44vの双方は、腫瘍微小環境との相互作用を促進し、さまざまなシグナル伝達経路の活性化を促進するヒアルロン酸結合モチーフをもつ。一方CD44vは主に上皮細胞に発現し、細胞接着、増殖、生存に関与する。さらにCD44vは個々のバリエーション領域で独自の機能を有しており、がんの増殖、浸潤、転移、幹細胞性の獲得に重要な役割を果たし、抗体医薬の標的として開発が続けられている⁶⁾。

図4AはCBIS法で樹立された抗体のなかで、エピトープが決定され、文献報告した抗CD44抗体を示している。得られたクローンはC₄₄Mab- (番号) と命名している。いずれの抗体も解離定数 (K_D) が $10^{-8} \sim 10^{-10}$ M程度の結合親和性を示し、フローサイトメト

※4 クラススイッチ

抗体のアイソタイプやサブクラスを改変すること。例えばマウスIgG1をIgG2aに変換することでFc受容体への結合性が増強し、抗腫瘍活性を検討する研究に応用できる。

※5 (ヒト) キメラ化抗体, ヒト化抗体

(ヒト) キメラ化抗体は、マウス抗体の可変領域をヒト抗体の定常領域に連結したもの。Cetuximabはその1例。ヒト化抗体は、マウス抗体の相補鎖決定領域をヒト抗体の可変領域に移植したもの。Trastuzumabはその1例。キメラ化、ヒト化抗体はマウス由来の部位が減少するため、投与された抗体に対する抗体の出現率が低くなる。

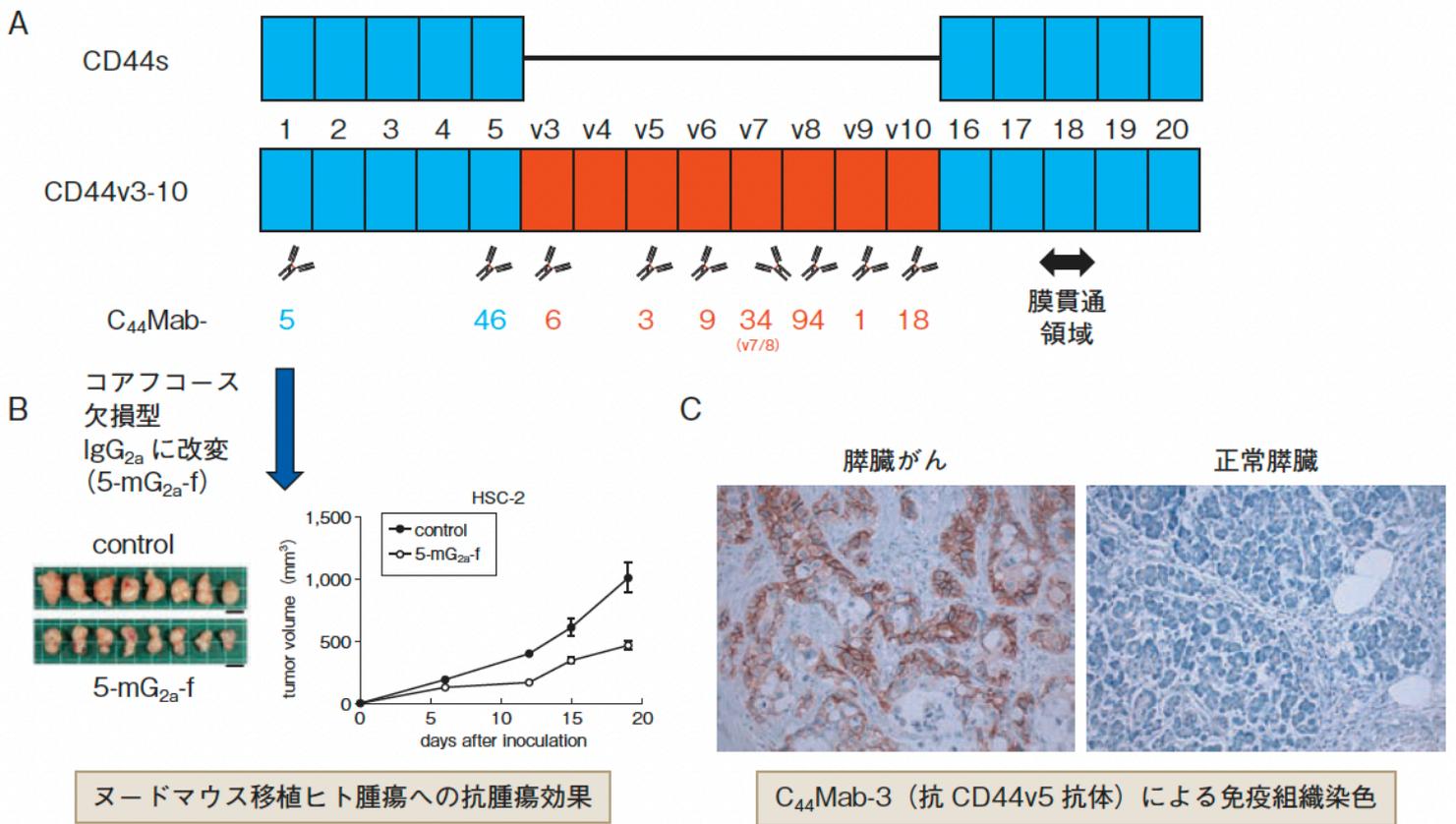


図4 CBIS法で樹立された抗CD44抗体

A) CD44v3-10発現細胞を免疫することで得られた抗体 (C₄₄Mab) のうち, ELISA法でエピトープ領域が特定できた抗体を示す. すべての抗体で, フローサイトメトリー, ウェスタンブロット, 免疫組織染色での利用が可能である. B) C₄₄Mab-5抗体は, コアフコース欠損型IgG_{2a}抗体 (5-mG_{2a}-f) に改変・生産し, マウス移植腫瘍モデルで抗腫瘍活性を發揮することを示した (左下)⁷⁾. C) CD44v5領域を認識するC₄₄Mab-3抗体は, 膵臓がん特異的な染色パターンを示し, 正常膵臓組織には反応しなかった⁸⁾. その他領域を認識する抗体も多数樹立されている. (Bの画像とグラフは文献7, Cの画像は文献8より転載)

リー, 免疫組織染色, ウェスタンブロットに使用可能であることを確認している.

C₄₄Mab-5やC₄₄Mab-46は, CD44sとCD44vに共通するエクソン1, 5にコードされる領域を認識する. C₄₄Mab-5はIgG₁であったが, 抗体遺伝子のクローニング後, ADCC活性を有するIgG_{2a}に改変し, さらに*Fut8*遺伝子をノックアウトしたCHO細胞を用いることで, ADCC活性を増強させるコアフコース欠損型抗体を生産した. このリコンビナント抗体 (5-mG_{2a}-f) は, ADCCやCDC活性を示し, マウス移植腫瘍モデルで抗腫瘍活性をもつことを報告している (図4B)⁷⁾.

さらにバリエーション領域を認識する抗体としてはv4領域以外のすべての領域を認識する抗体の樹立に成功している. C₄₄Mab-6 (v3領域), C₄₄Mab-3 (v5領域), C₄₄Mab-9 (v6領域), C₄₄Mab-94 (v8領域), C₄₄Mab-1 (v9領域), C₄₄Mab-18 (v10領域) は各バリエーション領域を認識し, C₄₄Mab-34はv7とv8の境界

領域を認識する. これらはすべてELISA法によりエピトープが決定されており, 各領域の合成ペプチドを認識する. したがってこれらの抗体は糖鎖修飾などの影響を受けずに, 各バリエーションを認識できると考えている. v5領域を認識するC₄₄Mab-3は, 免疫組織染色で膵臓がんを染色し, 正常膵臓上皮細胞は染色されないことを報告している (図4C)⁸⁾.

この他にもさまざまな領域をエピトープにもつ抗CD44抗体が樹立されている. そのなかにはELISA法ではエピトープを同定できず, 立体構造や糖修飾部位を認識すると考えられる抗体がより多く樹立されており, 同じバリエーション領域を認識する抗体でもクローンにより認識するエピトープは異なると考えられる. このようにCBIS法はさまざまなエピトープをもつ抗体を網羅的に樹立する有用な方法であると考えている.

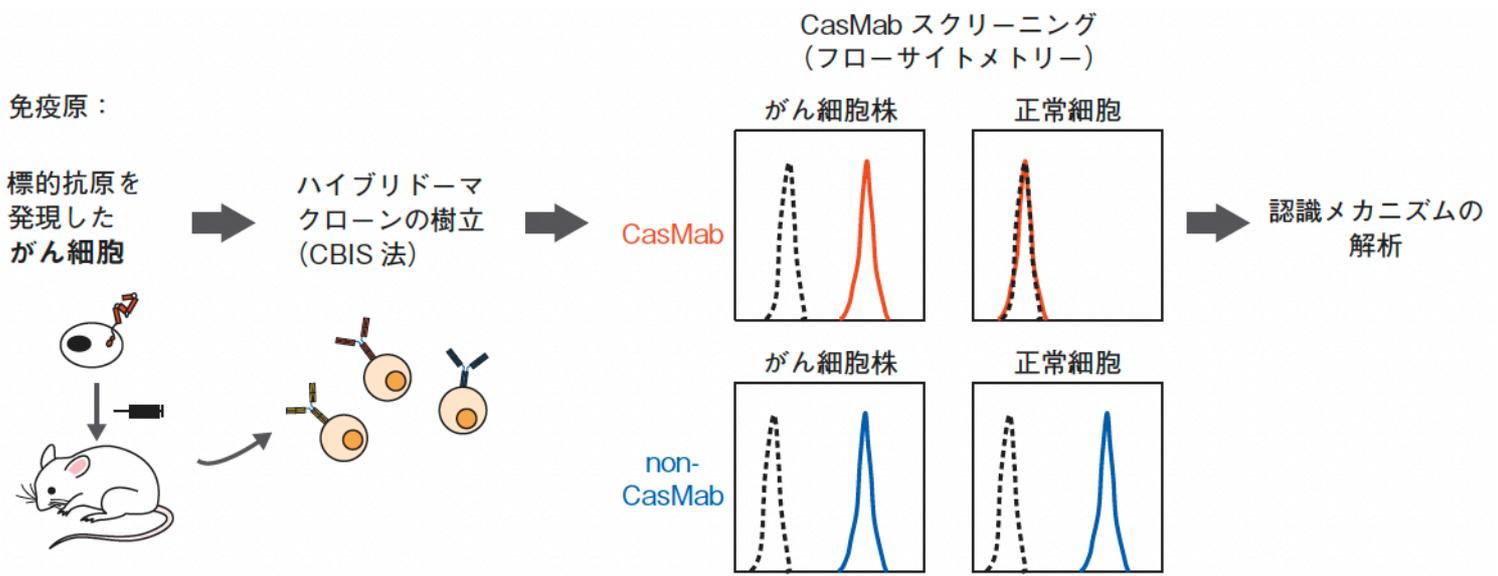


図5 フローサイトメトリーを用いたがん特異的抗体 (CasMab) の選択

スクリーニングには標的抗原を発現する正常、がん細胞を複数用いる。CBIS法で樹立された抗体をこれらの細胞群に処理し、フローサイトメトリーで反応性を確認する。多くの抗体はがん細胞と正常細胞の両方に反応する (non-CasMab)。これにより抗原自体の発現量をがん細胞と正常細胞で確認できる。一方でクローンのなかにはがん細胞には反応するが、正常細胞群には全く反応を示さないものが存在する場合がある (CasMab)。現在までに複数の標的で、CasMab様の反応を示す抗体の樹立に成功している。その後エピトープや構造解析を行って、抗体の認識メカニズムを明らかにする。

3 がん特異的抗体の選別

がん特異的抗体 (CasMab) は、2014年に加藤らにより、がん細胞で発現するポドプラニンを特異的に認識し、リンパ管内皮細胞のような正常細胞は認識しない抗体として報告された⁹⁾。ポドプラニンに対するCasMabは、がん細胞特異的に付加される糖鎖とペプチドを認識部位に含むことが明らかになった¹⁰⁾。一方で、エピトープに糖鎖が含まれていないCasMabも存在することが明らかになってきた¹¹⁾。開発当初は免疫組織染色でも利用可能である抗体が求められていたが、がん細胞で高発現している抗原の場合、免疫組織染色の感度は低いため条件設定によってはがん細胞特異的に染色されるような結果が得られる場合がある。このような場合、本当に正常細胞に反応していないのかは疑問が残る。抗体医薬として使用される抗体の場合、生細胞の細胞膜上に発現している抗原を認識する必要があるが、免疫組織染色では細胞の固定や抗原賦活化の処理によって、どの程度生細胞と同等の抗原性が保たれているかも不確定である。したがって現在でのCasMabのスクリーニングは、高感度フローサイトメトリーによる評価が重要であると考えている。この評

価系では、Trastuzumabのような臨床応用されている抗体も正常細胞に反応することが明らかになっている。

われわれは抗体樹立の過程で、標的抗原をCHO-K1以外にもさまざまながん細胞に発現させ、それらを免疫することで1抗原あたり最大300程度のハイブリドーマクローンを樹立している。このなかには反応性、エピトープの異なる抗体が含まれている。フローサイトメトリーを用いたCasMabのスクリーニングの模式図を図5に示す。われわれは複数のがん細胞と正常細胞株のパネルを標的ごとに準備し、前述のハイブリドーマが産生する抗体の反応性を網羅的に解析している。多くの抗体はがん細胞と正常細胞の両方に反応する (non-CasMab)。これにより、抗原自体はがん細胞と正常細胞に発現していることも確認できる。一方でクローンのなかにはがん細胞には反応するが、正常細胞群には全く反応を示さないものが存在する場合がある (CasMab)。現在までに複数の標的で、CasMab様の反応を示す抗体の樹立に成功している^{12) 13)}。これらのCasMabがどのようなメカニズムでがん特異性を出しているかは、個々の標的で異なると考えられるが、近年一部のCasMabについてはその認識メカニズムが明らかになりつつある¹⁴⁾。さらにこのようながん特異性

が、実際に生体内で反映されるのかについては今後の検討課題である。

4 抗体医薬への応用

図1に示すように、固形腫瘍の治療で承認された標的は限定的であり、がん細胞のみに高発現する標的分子の枯渇がしばしば論じられている。がん細胞には高発現するものの、正常細胞にも発現するため開発が中止された抗原も数多く存在する。CD44もそのような標的の1つで、特にCD44vはがん進展を促進するさまざまな機能をもつことから(図3)、がんに対する抗体医薬の標的として開発が続けられてきた。そのなかでもBivatuzumab mertansineは、1990年代に樹立された抗CD44v6抗体VFF-18¹⁵⁾より開発されたADCである。しかしながらBivatuzumab mertansineは臨床試験で強い皮膚毒性が出るのが明らかになり、開発は中止された。CD44sやCD44vは皮膚のような正常重層扁平上皮にも発現が認められ、それがmertansineの毒性の原因と考えられている。一方で、VFF-18から開発されたCAR-Tが、急性骨髄性白血病や多発性骨髄腫の治療薬として臨床開発されている。特に*FLT3*や*DNMT3A*遺伝子に変異をもつ急性骨髄性白血病ではCD44v6が検出され、これは正常造血幹細胞には発現しないことから、白血病細胞に選択的に発現する標的であると考えられている¹⁶⁾。このようなCAR-Tが皮膚などの正常組織に対する毒性をどの程度示すかについては不明である。われわれはCD44に対するCasMabのスクリーニングも進めており、正常細胞には反応しないCasMabをさまざまなモダリティと組み合わせることで、より副作用の少ない抗体医薬の開発につながることを期待している。また本手法が、正常細胞への毒性から開発が断念されていた標的に対して新たな可能性を開く技術になることを期待している。

おわりに

現在までにCBIS法を用いて、さまざまなタイプの細胞膜タンパク質(1回、2回、4回、5回、7回膜貫通型)に対する抗体樹立に成功している。これらは抗体

バンク (http://www.med-tohoku-antibody.com/topics/001_paper_antibody_PDIS.htm)にてアップデートしている。近年抗体医薬は、がん、免疫疾患のみならず、アルツハイマー病などの神経変性疾患¹⁷⁾への臨床応用が進められており、老化細胞除去¹⁸⁾の基礎研究も進んでいる。CBIS法はがんのみならず、さまざまな病態の細胞を認識する抗体開発への道を開く手法であると考えている。

文献

- 1) Tsao LC, et al : Cancer Res, 81 : 4641-4651, doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-1109 (2021)
- 2) Dumontet C, et al : Nat Rev Drug Discov, 22 : 641-661, doi:10.1038/s41573-023-00709-2 (2023)
- 3) Modi S, et al : N Engl J Med, 387 : 9-20, doi:10.1056/NEJMoa2203690 (2022)
- 4) Jin S, et al : Signal Transduct Target Ther, 7 : 39, doi:10.1038/s41392-021-00868-x (2022)
- 5) Labanieh L & Mackall CL : Nature, 614 : 635-648, doi:10.1038/s41586-023-05707-3 (2023)
- 6) Zöller M : Nat Rev Cancer, 11 : 254-267, doi:10.1038/nrc3023 (2011)
- 7) Takei J, et al : Oncol Rep, 44 : 1949-1960, doi:10.3892/or.2020.7735 (2020)
- 8) Kudo Y, et al : Antibodies (Basel), 12, doi:10.3390/antib12020031 (2023)
- 9) Kato Y & Kaneko MK : Sci Rep, 4 : 5924, doi:10.1038/srep05924 (2014)
- 10) Suzuki H, et al : Cells, 11, doi:10.3390/cells11030575 (2022)
- 11) 加藤幸成, 金子美華 : 実験医学, 40 : 3331-3339 (2022)
- 12) Suzuki H, et al : preprints.org, doi:10.20944/preprints202309.0906.v3
- 13) Kaneko MK, et al : Biochem Biophys Rep, 24 : 100826, doi:10.1016/j.bbrep.2020.100826 (2020)
- 14) Arimori T, et al : Sneak Peak, doi:10.2139/ssrn.4565236 (2023)
- 15) Heider KH, et al : Cancer Immunol Immunother, 43 : 245-253, doi:10.1007/s002620050329 (1996)
- 16) Tang L, et al : Clin Transl Med, 12 : e1043, doi:10.1002/ctm2.1043 (2022)
- 17) 漆谷真 : 実験医学, 40 : 3371-3376 (2022)
- 18) Wang TW, et al : Nature, 611 : 358-364, doi:10.1038/s41586-022-05388-4 (2022)

<筆頭著者プロフィール>

鈴木裕之 : 東北大学医学系研究科, 准教授. 博士(薬学). 2001年東京大学薬学系研究科修了後, がん研究会, 東京大学医学系研究科でポスドク. '04年より筑波大学医学医療系を経て, '21年から現職. がん進展の分子メカニズムの解明, 新規抗体を用いたがんの診断, 治療薬の開発を進めている。