

図1. 通常の抗体とNanobodyの違い

(A) 通常のモノクローナル抗体(mAb)はH鎖&L鎖のヘテロダイマーからできている。(B) 重鎖抗体(HCAb)はH鎖のホモダイマーからできている。HCAbの変換領域をVHHと呼ぶ。(C) VHHの遺伝子はこのようになっている。CDRは相補性決定領域であり、FRはNanobodyの構造を保つために重要な役割を果たす部分。この遺伝子を微生物に導入してタンパク質合成を行うと、(D)に示したNanobodyが発現する。

ラクダ科由来Nanobody

ヒト型ユニバーサルNanobody

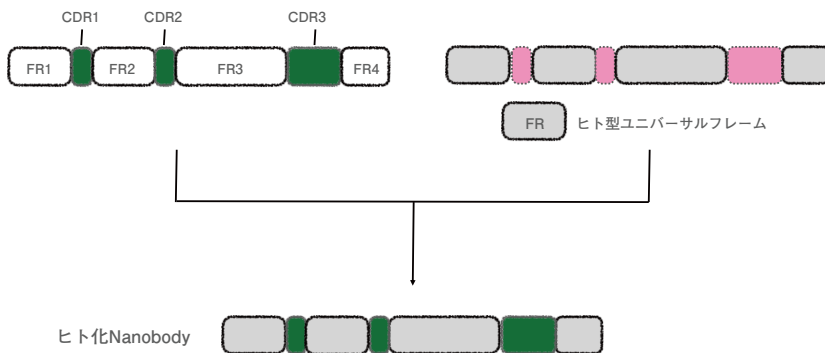


図2. ヒト型Nanobodyの作製

ラクダ科Nanobody由来のFRを、ヒト型ユニバーサルNanobody由来のFRに組み替えることでヒト化する。

る<sup>[10-12]</sup>。このような迅速なクリアランスは、静注薬として利用する場合、血中濃度を保つことができず、そのままの形状では薬効を保つことが難しい場合がある。その一方、Nanobodyを用いた標的分子のイメージングを行う場合、画像トレーサーとしてラベルし

たNanobodyを注入後、バックグラウンド信号の強度が速やかに低下するため、標的部位の画像が速やかに取得可能であり、標的部位以外に与えるダメージを最小限に止めることができる<sup>[13-15]</sup>。ただし、腎臓内または腎臓に隣接する部位に標的部位がある場合、

Nanobodyが腎臓に集まり排泄されていくため、画像の取得は困難になる。このような現象を回避するため、Nanobodyはグリコシル化、PEG化、またはアルブミン結合ユニットとの融合などの修飾を与え、その血中半減期を延長させつつ、腎貯留を低下させる工夫が施されることがある<sup>[16,17]</sup>。このようなNanobodyの修飾は治療薬としての安定性と薬効の増強を図ることができる。また、ヒト抗体のFcドメインをNanobodyに融合させたキメラ抗体を作成すれば、胎児性Fc受容体による抗体のリサイクル経路が働き、血中抗体濃度と維持時間とを延長できる。しかし、Fcドメインの付加は、Nanobodyに免疫細胞媒介性または補体依存性細胞傷害の機能を付加してしまう。このような性質の付与は、用途によっては求められない場合もある。

Nanobodyは、先述のとおりラクダ科の動物から発見されたHCAbのVHH部分を利用したものであり、ヒト体内には存在しないタンパク質である。そのため、人体に投与する場合、Nanobodyの由来元である動物のVHH部分に対する抗体が誘導される心配がある。このような副反応を避けるため、Nanobodyのヒト化が行われる。ヒト化には、一般的にCDR-graftingが用いられる。CDR-graftingとは、組換えDNA技術を使って、NanobodyのCDR1~3以外をすべてヒト由来の配列に変更し、ヒトに対する抗原性を低減する方法である。具体的なヒト化は、NanobodyのFR1~4を全て相同性が高いヒト配列と置き換えることにより実施

する。図2に模式図を示した<sup>[18]</sup>。

### 治療用Nanobody

Nanobodyは、抗原特異的結合能を有する最小のタンパク質構造体と考えられる。遺伝子配列合成からタンパク質構造体の産生まで、試験管内で実施可能であり、抗ウイルス剤として期待されている。通常モノクローナル抗体と同様に、Nanobodyは膜貫通受容体や可溶性リガンドと結合して下流のシグナル伝達経路を調節することができる<sup>[19]</sup>。Nanobodyの長いCDRドメインは、モノクローナル抗体が到達できないエピトープに結合することができるため、標的エピトープは、分子内に折りたたまれたペプチド配列でも良く、そこに手を伸ばすようにCDRを挿入して結合することができる<sup>[46]</sup>。VHHの遺伝子进行操作することにより、多価または多重特異的なNanobodyを調製して、従来の抗体と同様またはより強い結合を発揮できるようにすることもできる。我々は、このようなNanobodyの特長を生かし、VHH-cDNAディスプレイライブラリーより、SARS-CoV-2 S1タンパク質に対するVHHを*in vitro*で選択した(図3)。この方法では、 $10^{13-14}$ 種類の多様なcDNAライブラリーからSARS-CoV-2 S1タンパク質に高い親和性を示すNanobodyを選択し、同時にそのNanobodyの遺伝子配列も入手できる。スクリーニングは極めて迅速であり、我々は、僅か2週間でSARS-CoV-2 S1タンパク質特異的

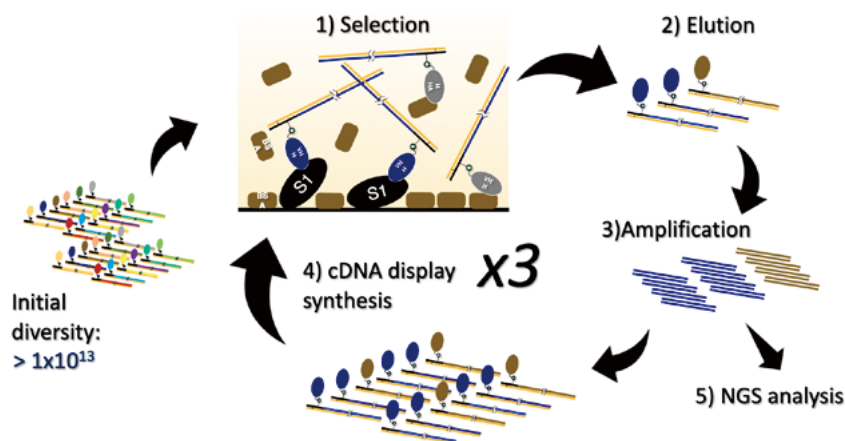


図3. VHH cDNAディスプレイライブラリーからのスクリーニングの模式図  
1) 抗原に対する反応、2) 溶出、3) PCRによる核酸増幅、4) cDNAディスプレイを合成し直し、行程1)から繰り返す。この作業を3~5回実施して、特異性の高いNanobodyを得る。5) 選択されたNanobodyの遺伝子配列情報は次世代シーケンサー(NGS)で得られる。

な結合能力を有し、且つウイルス感染を中和する活性を持つNanobodyを得ることができた。このNanobodyは、COVID-19の小動物モデルであるシリアンハムスターへのSARS-CoV-2の感染・COVID-19の治療において顕著な効果を示した<sup>[20]</sup>。Nanobodyは、Fcドメインを有さないため、通常の抗体が有する免疫細胞媒介性または補体依存性細胞傷害の能力を持たないが、別の抗炎症性ペプチドで修飾するなど、多機能タンパク質/ペプチドを形成させれば、急性呼吸器疾患などで問題となるサイトカインストームを抑えつつ、ウイルスの中和によって治療効果を増強させるようにデザインすることも可能である。

### 分子イメージング用Nanobody

異なる同位体または蛍光団による標識をしたNanobodyは、単光子放出コンピュータ断層撮影

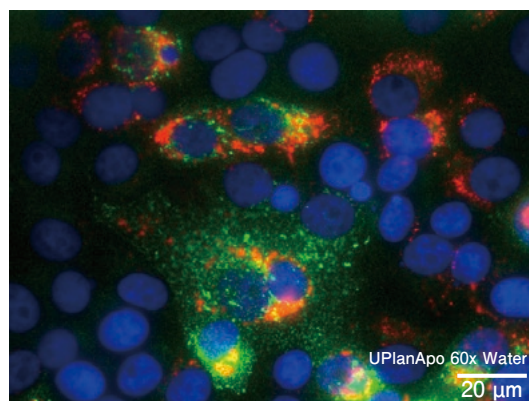


図4. SARS-CoV-2感染後32時間後のVero細胞の免疫染色  
青色は細胞核、核の周りの細胞質全体にウイルスタンパク質(緑:Sタンパク質、赤:NSP8)が発現している。(細胞固定、北里大・片山ら、免疫染色、理研・宮脇ら)

(SPECT)、ポジトロン放出断層撮影(PET)、光イメージングなどの標準的な画像技術を用いて、非侵襲的に生体内または細胞内の標的分子の挙動を追跡することができる。さらに、標的分子とリガンドとの相互作用を、高感度かつ定量的に可視化することも可能である<sup>[8,21,22]</sup>。我々は、現在、理化学研究所の宮脇敦史博士らとの共同研究において、抗SARS-CoV-2 Sタンパク質Nanobodyと彼らの開発した高輝度かつ退色のない蛍光タンパク質を融合タンパク質として発現、修飾して、SARS-