

[別 紙 2]

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 デシルバ デヒンガ プラサディ ナヤナシャニ

本論文は 6 章から構成されている。

1 章は序論である。サメには IgM、IgW および免疫グロブリン novel antigen receptor (IgNAR) という 3 種の Ig がある。診断薬および治療薬としてモノクローナル抗体は有用であり、IgNAR はサイズが小さく、抗原特異的であり親和性の高いモノクローナル抗体（ナノ抗体）として利用できる可能性がある。本研究では、テンジクザメ目のイヌザメ (brownbanded bamboo shark、*Chiloscyllium punctatum*) から抗原特異的 vNAR を単離するための新規プラットフォームを開発することを目的としたことが述べられている。

2 章はイヌザメ IgNAR 定常領域の特徴について述べられている。イヌザメの末梢白血球 (PBL) から得た mRNA のトランスクリプトーム解析を行なった結果、イヌザメ

には2種類の異なる定常領域をもつ IgNAR が存在することがわかった。さらに、系統発生解析で、同じテンジクザメ目のコモリザメ (*Ginglymostoma cirratum*) とオオセ (*Orectolobus maculatus*) の配列に最も類似性が高いことが示された。ヒト IgG 定常領域と比較し、Ig の進化を通じてシステイン残基が保存されていることが示された。

3章は抗原に対するイヌザメの vNAR による多様な応答について述べられている。vNAR の応答を確認するため、鶏卵リゾチーム (HEL) 注入により成体サメを免疫し、末梢血白血球 (PBL) を採取して cDNA ライブラリーを合成した。3ステップの tailed PCR をデザインし、Illumina amplicon sequencing を使用して、8.41GB のデータ (1930 万配列) で構成される vNAR ライブラリーを得た。これを解析した結果、以下のことが示された。1) 配列比較から、CDR3 より CDR1 で変異が多いことがわかった。しかし、CDR1 および CDR3 変異体は、抗原曝露の回数が増えるにつれ減少した。2) タイプ I の配列が、1 回目の抗原曝露後に非常に低い発現レベル (1/100,000) でみられた。3) HEL 曝露後に、得られた vNAR 配列とともに、IgNAR 力価も上昇した。これらの結果は、サメ個体間の vNAR の多様性および曝露回数による変動性を示すものである。

4章はトランスクリプトーム解析により抗原に対する免疫応答の様相について解析した結果が示されている。HEL 免疫後のイヌザメの PBL がどのように応答するかについてトランスクリプトーム解析を実施して調べた。免疫前（対照）および免疫後のイヌザメの PBL から RNA-seq ライブラリーを作成し、約 4000 万のシーケンスリードを得た。解析の結果、抗原曝露後は Ig 産生を負に調節する遺伝子はダウンレギュレートされたが、補体活性化、レクチン経路の調節、細胞防御応答の調節はアップレギュレートされた。すなわち、抗原に対する大きな適応免疫応答が示された。

5章では vNAR のトランスクリプトームに基づくモノクローナル抗体遺伝子の選抜に関する記述である。モノクローナル抗体の開発は現在のトレンドであり、ナノ抗体のような小さい組換え抗体フラグメントおよび抗体の変異体の使用により開発は増加・進歩すると予測される。サメ vNAR は開発に寄与する潜在的候補であると考えられる。上記と同様、成体サメを HEL で免疫し、末梢血白血球の mRNA から cDNA アンプリコンライブラリーを作成した。ペアドエンドアセンブリ後のユニーク配列を存在量によりリスト化し、免疫前後の発現を比較した。その中から、3 回目の免疫後に多く発現された配列を選択し抗 HEL vNAR の候補遺伝子を得た。Chimera ソフトウェアを使用して、抗原抗体複合体間の接触回数ごとの抗原結合の強度を推定し、親和性が最高となる

vNAR 遺伝子配列を選定した。この抗 HEL ナノ抗体を合成するため、この配列を哺乳動物発現ベクター pEHX1.1-N.S.-IgNAR-Fc (阪大大政ラボ) に挿入した。このようにして CHO 細胞株を用いる vNAR 抗体発現プロトコルを作成した。抗原特異的 vNAR の単離および発現のため、この新規プラットフォームは、ファージディスプレイのような従来法に比べ少ない費用および時間で、サメ起源のモノクローナルナノ抗体の単離、同定に資すると期待される。

6 章では総合的な考察がなされ今後の研究の可能性について述べられている。

本研究では抗原に対する特異的モノクローナル抗体をスクリーニングするための一連の実験を確立することができた。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。