

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 永野 竜馬

本学位論文では、抗体医薬の創薬基盤技術の中核に位置するタンパク質発現系に着目して **CHO** 細胞と大腸菌の双方に機能しうるシグナルペプチドを確立し、シグナルペプチドや宿主を含めたタンパク質発現系の改良によって抗体生産基盤だけでなく、難発現性の **Fc** 受容体の調製法、フコース非修飾抗体との結合活性測定系を構築することで、創薬基盤技術への実装や研究開発の効率化を目指している。

本論文は 4 章より構成されている。第 1 章は本論文の序論であり、抗体医薬品の現状と課題に加えて創薬基盤技術の重要性と本研究の関連性を述べている。第 2 章は、**CHO** 細胞と大腸菌の双方に機能しうるシグナルペプチドの研究について述べられている。両者は抗体分子を発現させる場合の宿主として広く利用されているが、真核生物と原核生物という大きな違いがありタンパク質発現機構も異なる。そこで、創薬研究の過程で得られた抗体由来のシグナルペプチドのうち、宿主の種選択性回避を目的としてシグナルペプチドの骨格を選定した。このマウス抗体軽鎖由来の配列は **CHO** 細胞で機能する上、微生物でも機能すると提唱されている法則性にも従うため大腸菌でも機能しうると考えられた。よって、抗 **HER2** 抗体をモデルとして、**Fab** 発現ベクターに当シグナルペプチドを連結させ、大腸菌にて分泌発現させたが実際には **Fab** 発現は確認されなかった。そこで、**c-region** の C 末端から数えて-3 番目と-1 番目にアラニン残基への選択性がある可能性に着目し、当該箇所のセリンをアラニンに置換して発現させたところ、個々の改変が **Fab** 発現向上に寄与する上、その組み合わせによって相乗的に発現が上昇する結果となった。精製した試料を **ELISA** による **HER2** 抗原への結合活性を評価したところ、同等の結合活性を有していることが確認された。更に、この改変したシグナルペプチドは **CHO-DG44** における全長抗体 (**IgG**) の安定発現系においても機能を保持し、同じく **ELISA** による **HER2** 抗原への結合を有することを確認した。この結果により、切断反応の酵素であるシグナルペプチダーゼの厳密な基質特異性が関与していることが示唆された。特に原核生物の場合は、当該領域のアラニンへの改変がシグナルペプチダーゼの反応近傍にある結合ポケットへの親和性を高めた可能性が考えられた。

第 4 章では、3 章での知見を活かし抗体以外のタンパク質分子創製に応用すべく、難発現性の **Fc** 受容体調製を試みている。今回、細胞外ドメインとして調製

した報告例のないハムスターFc $\gamma$ RIVを安定的に調製できるようタンパク質発現系を改良した。3章で用いた CHO-DG44 よりも増殖速度の速い CHO-K1 の亜株を用いると共に、当受容体由来シグナルペプチド配列の h-region が N 末端側に偏っていたところから、3章で確立したシグナルペプチドも活用することで、ハムスターFc $\gamma$ RIVの安定発現細胞を取得することに成功した。取得した細胞をフェドバッチ培養して得た上清を精製し、SDS-PAGE と Western Blotting に供したところ、糖鎖を含めて目的とする位置にバンドが認められた。当試料の精製度が高くなかったため、ELISA や Gel Shift assay に替わる生体分子間相互作用の検出法を探索し、細胞抽出液や血清を用いた分析実績のある BLI を用いて抗体 Fc との結合評価系を試行した。BLI 評価系の構築あたっては、一定の波長シフトに達するまでバイオセンサーに結合後、ヒト IgG 抗体をアナライトとして添加したところ、特異的結合を確認した。次に、抗体 Fc 領域の 297 番目のアスパラギン残基に結合する N 結合型糖鎖中フコースを除去したフコース非修飾抗体を用いて評価した。抗 DNP ヒト Ig G 抗体をモデルとして、フコース純度を制御したフコース非修飾抗体と修飾抗体を用いて濃度依存的な結合を確認したところ、フコース非修飾抗体でハムスターFc $\gamma$ RIVの結合上昇が認められた。次に、フコース非修飾抗体の結合上昇について、ハムスターFc $\gamma$ RIV発現細胞を用いて FCM でも確認することとした。Fc $\gamma$ RIV発現が期待でき、入手可能であるシリアンハムスター由来マクロファージ細胞株 HM-1 を入手し、培養法を確立した。FCM を用いて抗 DNP 抗体のフコース非修飾抗体と修飾抗体を用いて結合性を評価したところ、フコース非修飾抗体でハムスターFc $\gamma$ RIVの結合上昇が認める結果が示唆された。ヒト Fc $\gamma$ RIIIa 配列と相同比較したところ、フコース非修飾抗体のハムスターFc $\gamma$ RIVへの結合上昇はヒトと同様のメカニズムによる可能性が高く、今回構築した手法はハムスターで ADCC 増強抗体を薬理評価する際に、種差解析の応用が期待できる。第4章は論文の総括と今後の展望となっている。

以上、本研究において、CHO 細胞と大腸菌の双方に機能しうるシグナルペプチドを確立し、特に原核生物においては c-region の改変が重要であることを実験的に明らかにしている。真核生物と原核生物の種を越えて対応可能なシグナルペプチド構築の前例はなく、その方法論は独創的なものと言える。難発現性の Fc 受容体調製にあたっては、シグナルペプチドや宿主を含めたタンパク質発現系の改良によって可能にした。精製度や細胞入手の制約もありながら、ハムスターFc $\gamma$ RIVとフコース非修飾抗体との結合活性測定系を構築し、ADCC 活性を増強した抗ウイルス薬の研究効率化という重要なコンセプトも含んでいる。このように本論文はバイオエンジニアリングの分野において重要な研究指針を与える得るものである。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。