

審査の結果の要旨

氏名 渡邊 裕治

本論文は6章より構成されている。第1章は本論文の序論である。第2章は、抗 ROBO1 二重特異性抗体の分子設計について述べられている。肝がん細胞などに高発現することが知られている Roundabout (ROBO) 1 に対する B2212A と B5209B の一本鎖抗体 (scFv) と、ヒト抗体の hFc を融合させる二重特異性抗体の作製を行った。作製する抗体は、バキュロウイルス発現系を用いた。scFv 型の二重特異性抗体として、4つのグリシンと1つのセリンからなる G4S リンカーを4つつなぐことによって作製したリンカー (G4S)₄ を一本鎖で二つの scFv 間をつないだタンデム型または二本鎖の (G4S)₄ をつないだダイアボディ型、そして hFc の N 末端と C 末端に scFv を融合させたイムノフュージョン型を設計した。ダイアボディ型に関しては、フォールディングし合う2つの scFv を一本のポリペプチド鎖で発現させたものと、二本のポリペプチド鎖で発現させたものを設計した。また、各々について、scFv の順番を入れ換えたコンストラクトを作製した。なお、scFv を一本鎖でフォールディングさせる場合は、重鎖と軽鎖の可変領域を (G4S)₄ リンカーで融合させた。示唆走査蛍光定量法 (DSF) を用いた熱安定性解析から、scFv および CH2 ドメインの T_m 値を検証し、B2212A-B5209B Immunofusion が最も収率が高く、この抗体の発現精製をもって、本章で目的とする熱安定性を有する二重特異性抗体の分子設計が達成された。

第3章では、第2章で作製した二重特異性抗体が、単結合性抗体の親和性と比べて向上していることを、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて証明した。また、二重特異性抗体の反応熱が、等温滴定型熱量計 (ITC) を用いて、二つの単結合性抗体の反応熱の和に等しくなることを証明した。ROBO1 抗原と二重特異性抗体の結合比について検証を行うことで、抗体プロトマーに対して、分子内結合する抗体と分子間結合する抗体を作製したことを示した。と第2章で検証した熱安定的に作製できた抗体と、その抗体の抗原への親和性について、比較検討する。

第4章では、第2章で作製した二重特異性抗体が、哺乳細胞株が発現する多

量体を形成する ROBO1 に対する結合を示す可能性について検証を行った。分析カラムを用いた解析によって、ROBO1 の多量体形成を確認し、この ROBO1 抗原に作製した単結合性および二重特異性抗体が結合することを抗体カラムを用いた実験系により示した。

第 5 章では、ROBO1 を発現する肝臓がん培養細胞株を用いて、作製した二重特異性抗体ががん細胞上に発現する ROBO1 にも結合できるかを調べている。さらに、ROBO1 のリガンドである Slit2N の結合によって構造が変化する ROBO1 に対して、第 3 章までに作製した二重特異性抗体が結合できるかについて、フローサイトメトリーを用いた実験系により検証した。その結果、Slit2N は抗体よりも優位に結合することが示唆された。第 6 章は本論文の総括と今後の展開となっている。

以上、本研究では、scFv-hFc 型抗 ROBO1 二重特異性抗体を開発し、この抗体が抗原に対し高親和性に結合できることを示している。その作製過程で、DSF 測定によって抗体を構成する各ドメインの熱安定性の指標を取り入れながら分子設計をしたことと、SPR 測定によって親和性を評価し、これらを包括的に検証しながら目的とする抗体を作製したことにオリジナリティーがある。また、フローサイトメトリーを用いて、生きた肝がん細胞上に発現する ROBO1 抗原への二重特異性抗体の結合を測定したことと、リガンド結合による ROBO1 抗原の変化を考慮に入れた二重特異性抗体の結合を評価したことは、先行研究にないオリジナリティーが本研究にある。

その結果、特に本研究の重要性として、ITC 測定の結果、二重特異性抗体の中でも抗原に対し分子内結合していた抗体が、二つの scFv 間の距離と位置を変化させたことによって、分子間結合に変化したことが挙げられる。抗体の構造を変化させることによって、結合様式を作り変えられるという新たな知見を積み上げることができたと考えられる。

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。