

論文の内容の要旨

論文題目

免疫系細胞を利用した抗体分子進化基盤技術の構築

橋本 講司

【序】

抗体は、体内に侵入してきた病原菌やウイルスを認識して結合する性質を持ち、生体内において獲得免疫の中心的な役割を担っている。その抗原に対する高い特異性と親和性を利用して、生化学実験試薬や診断薬として長年の間重宝されてきた。さらに近年、単一の細胞クローンに産生させることによって得られる「モノクローナル抗体」を利用した医薬品が多数報告されている。以上のような背景から、治療効果の高い高機能化抗体を簡便に取得するための技術開発は非常に重要である。

これまで所属研究室では、独自の試験管内モノクローナル抗体作製技術である ADLib (Autonomously Diversifying Library) システムの開発を行ってきた。ニワトリ B 細胞由来の培養細胞である DT40 細胞をヒストン脱アセチル酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) 存在下で培養すると、染色体弛緩の促進により抗体の抗原認識領域である可変領域の遺伝子配列が著しく多様化される。ADLib システムではこの現象を利用して抗体作製を行う系である。DT40 細胞は膜結合型と分泌型の抗体発現していることから、DT40 細胞を TSA 処理して抗体ライブラリを作製し、磁気ビーズを固定した抗原により、膜結合型抗体を介しモノクローナル抗体発現細胞クローンを選抜する。得られた抗体の特異性は培養上清中の分泌型抗体を用いた ELISA や FACS により確認できる。ADLib システムは、抗体ライブラリ樹立の簡便性と抗体獲得までの迅速性において非常に優れており、これまでに多くのモノクローナル抗体作製実績がある。

【抗体 Fc 領域迅速改変システムの開発および Fc エンジニアリングの実践】

野生型の DT40 細胞が発現する抗体のクラスが IgM 型であるため、ADLib システムの課題の一つとして、作製した抗体が IgM 型になってしまうという点が挙げられた。IgM は一般的に不安定であることに加え、精製が困難である等の欠点があり、抗体医薬や診断薬への応用を目指すには IgG 型抗体を簡便かつ迅速に作製できることが望ましい。そこで所属研究室では、DT40 細胞の Fc 領域抗体遺伝子座に対して部位特異的組換え法である Cre/loxP 系を適用した技術が開発された (Cre-In システム)。Cre-In システムではまず、遺伝子ターゲティング法を利用して、DT40 細胞に Cre/loxP 系を導入した「Cre-In システム搭載細胞」を樹立する。この細胞株に対して Cre リコンビナーゼ発現プラスミドとドナーベクターを導入することで、ADLib システムによって作製した抗体の Fc 領域を改変することができる。Cre-In システムは、選抜薬剤を添加するだけという実験手法の簡便性、さらにわずか 5 日で機能改変抗体を得られるという迅速性の点で優れた技術であった。

しかしながら、この Cre-In システム搭載細胞は以下のような問題点を内包していた。すなわち、本細胞は確かに IgG 型抗体を分泌しているが、膜表面にはニワトリ IgM 抗体しか発現しておらず、加えて分泌型抗体としても IgM を多量に発現しているという点である。つまり、従来の Cre-In システム搭載細胞を用いて ADLib システムを行う場合、磁気ビーズセレクションは抗原と膜型の IgM の結合を利用するが、一方で培養上清中の IgG 型抗体で ELISA を行う際、必ずしも IgM と同じ抗原特異性を示さないリスクがあると考えられる。加えて培養上清を用いて ELISA 等を実施する際、アビディティの高い IgM が多量に存在することで、IgG 型抗体由来のシグナルが極端に低下する懸念もあった。そこで、本博士論文の前半ではこうした問題点を解決するために、膜結合型、分泌型共に IgG 型だけを発現するような、「改良型 Cre-In システム」の開発を行った。これにより、ADLib システムの汎用性が著しく向上したことに加え、DT40 細胞を利用した Fc エンジニアリング技術の可能性が見出された。実際に本博士論文では、Cre-In システムを利用した Fc エンジニアリングの応用事例についても記述した。

【抗体分子進化基盤技術の開発】

本博士論文の後半では、Cre-In システムを抗体の抗原認識領域である可変領域に応用した「可変領域 Cre-In システム」の開発を行った。まず始めに、Cre/loxP 系および薬剤耐性遺伝子カセット配列を可変領域用に適用するための、遺伝子ターゲティングベクターおよびドナーベクターの開発を行うことで、Fc 領域の場合と同等の簡便性および迅速性で、可変領域遺伝子を改変できる技術を実現した。

次に、可変領域 Cre-In システムを利用して、マウス・ハイブリドーマ由来の外來性抗体遺伝子を導入し、DT40 細胞に外來性抗体を発現させる実験を行った。その結果、抗体の発現が著しく低下するという現象が生じた。この原因として軽鎖の発現量不足を示唆する結果が得られたため、まず遺伝子の並び順を改良し、さらに軽鎖の発現量を指標とする新たな戦略に基づいて遺伝子導入を行うことで、最終的に外來性抗体を発現できる「可変領域 Cre-In システム搭載細胞」を樹立するに至った。本博士論文ではこの細胞株を利用して、可変領域をさらに別のマウス由来抗体のものに置換

できること、またここで発現した抗体は元々持っている抗原特異性を維持していることを確認した。以上から DT40 細胞に任意の既存抗体を簡便に発現させるための基盤技術を確立することができた。

本博士論文の結果を総合すると、改良型 Cre-In システムおよび可変領域 Cre-In システムにより、DT40 細胞抗体遺伝子の可変領域から定常領域に至る全域を任意の外来性遺伝子に置換することが可能となったといえる。この「全領域 Cre-In システム」を利用すると、任意の抗体の高機能化を簡便に行うことができる。例えば定常領域に関しては、エフェクター機能を強化した Fc 領域変異配列の導入のような、必要に応じた機能を強化した抗体を取得できる。また可変領域に関しては、抗体可変領域に様々な変異を入れた配列を導入してライブラリを作製し、そこからより親和性の高い抗体を選別することも可能になる。すなわち、本技術はあらゆる高機能化抗体を簡便に取得するための分子進化基盤技術に発展することが見込まれる。こうした高機能化は ADLib システムで取得した抗体に限らず、外来性の抗体について実施可能な技術であることから、将来的には既存の抗体医薬品や診断薬など様々な抗体への適用も期待される。