

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 梶本 講司

抗体は、獲得免疫の中心的な役割を担う分子であり、病原菌やウイルスなどの抗原を認識し結合する性質を持つ。その抗原に対する特異性と親和性を生かし、抗体は実験試薬や診断薬として長年重宝されてきた。さらに近年、遺伝子工学技術の発展に伴い、抗体を医薬品として利用するための研究開発が急速に進展した。以上のような背景から、より高い治療効果の見込める高機能化抗体を取得するための技術開発は非常に重要である。

論文提出者の所属研究室では、免疫系細胞を利用した抗体作製技術の開発を行ってきた。そこで本論文では、免疫系細胞を利用して抗体を迅速かつ簡便に高機能化できる技術を開発するに至った結果を、2部構成で報告している。第1部では、抗体の物性および生理的機能に重要なドメイン（Fc領域）を遺伝子工学的に迅速に改変するための技術について記述している。さらに第2部では、より発展的な技術として、抗体の抗原認識を司る可変領域部分を迅速に改変し、発現させるための技術について報告している。

まず研究の意義を明らかにするために、序論では、抗体作製技術および抗体エンジニアリング技術について現状が概論されている。序論の前半では「学術的背景」と題して、まず抗体が多様性を獲得するメカニズムについて記述されている。さらに、医薬品開発の話題を軸として、今までの抗体作製技術・高機能化技術進展の経緯を概観したうえで、従来技術における高機能化抗体作製の研究課題が整理されている。序論の後半では「所属研究室における研究背景」と題して、免疫系細胞（DT40細胞）を利用した抗体作製技術（ADLibシステム）についての説明がなされている。そして、DT40細胞を利用した抗体エンジニアリング技術（Cre-Inシステム）がFc領域改変の有効な手段であることを、学術的背景と照らし合わせて論じる一方で、現状のCre-Inシステムでは実用上の問題があることを指摘している。そこで論文提出者は、改良型のCre-Inシステムを開発し、実際にFcエンジニアリングを実践することを、第1部の研究目的として設定している。

研究結果の第1部では「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」と題して、改良型Cre-Inシステムを確立したこと、そして、本システムによる高機能化抗体作製に成功したことを報告している。まず改良型Cre-Inシステムを作製するためのベクターを新たに設計し、野生型の

DT40 細胞に導入した (Cre-In システム搭載細胞)。Cre-In システムが正常に機能することは、複数の解析手法 (イムノドットプロット、フローサイトメトリー、RT-PCR) を用いて証明がなされた。また改良型 Cre-In システム搭載細胞を利用して ADLib システムによる抗体作製が可能であることも、複数の抗原を用いて実証された。さらに、Cre-In システムの応用例として、①抗体発現量を増強できること、②蛍光タンパク質融合抗体を作製できること、③細胞傷害性免疫細胞との相互作用を強化できることが示された。考察では、本論文で示した応用例以外にも、診断薬をニーズに合わせて改変する方法や、より治療効果の高い抗体医薬を選抜する方法について、実用性の観点から具体的な提案がなされている。

研究結果の第 2 部では「抗体分子進化基盤技術の開発」と題して、Fc 領域に適用していた Cre-In システムを、抗原認識部位である可変領域に適用するための研究について報告している。まず、「Fc 領域 Cre-In システム」と「可変領域 Cre-In システム」の相違を明らかにした上で、後者を確立するための新規のアイデアを提示し、実際に Cre-In システム搭載細胞を樹立した。可変領域 Cre-In システムが正常に機能することは、変異導入実験およびラクダ由来の重鎖抗体 (VHH) 発現実験によって証明されている。次に、最も一般的な抗体である、重鎖と軽鎖で構成される抗体の発現系構築を行った。ところが想定外なことに、軽鎖の発現量が著しく抑制されていることが示唆された。そこで論文提出者は、遺伝子の並び順を改良し、さらに抗体の抗原反応性を指標としたセルソーターによる選抜手法を新たに採用することで、重鎖と軽鎖で構成される抗体を発現できる DT40 細胞株を樹立することに成功した。最後に、この細胞株を用いて Cre-In システムを実施することで、発現する抗体の種類を置換可能であることを示すに至っている。以上の結果は、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が確立されたことを十分に証明していると言える。

DT40 細胞は、薬剤添加のみで変異誘導ができること、倍加速度が速いなどの特長を有しており、抗体の分子進化実施に適している。一方で従来技術では、外来性の抗体を自在に発現させることは困難であった。論文提出者が本論文で確立した Cre-In システム搭載細胞を利用すれば、外来性抗体発現細胞を迅速に取得し、そのまま高機能化抗体選抜に使用できる。このような同一の培養細胞を利用して抗体の作製とエンジニアリングを一貫して行うことのできる技術は従来技術と比較しても非常に画期的であり、今後幅広い応用が期待されることから、本研究は当該分野において重要な貢献を果たしたと考えられる。従って、審査委員会は論文提出者である梶本講司を博士 (学術) の学位を授与するにふさわしいものと認定する。