

博士論文（要約）

免疫系細胞を利用した抗体分子進化基盤技術の構築

梶本 講司

第 1 章 序論

1-1 学術的背景

1-1-1 抗体の機能と構造

生物は、非自己を認識・排除し個の生命システムを維持するために、免疫システムを進化させてきた。多くの高等生物は、生来的に備わっている「自然免疫」と後天的に獲得される「獲得免疫」という二段構えの高度な免疫システムを駆使して、細菌やウイルスなどの病原体に対抗している。

自然免疫は、マクロファージや樹状細胞、好中球といった免疫細胞が行う反応であり、貪食作用などにより直接的に病原菌を攻撃するための初期免疫反応である。一方、獲得免疫は B 細胞や T 細胞がその役割を担っており、共通する特徴として、病原体（抗原）の一部（エピトープ）を特異的に認識するためのタンパク質である抗原受容体を発現していることが挙げられる。特に成熟 B 細胞によって大量に作製され、生体内に分泌される抗原受容体は「抗体（免疫グロブリン）」と呼ばれ、体液性免疫の中心を担う分子である(Schroeder & Cavacini, 2010)。

抗体は、病原体に結合してその病原性を抑制することができる。さらに抗体は抗原に結合すると、NK 細胞やマクロファージなどの細胞傷害性細胞の誘引を介して非自己の殺傷を誘発したり（抗体依存性細胞傷害活性、ADCC 活性）、補体と呼ばれる分子群を呼び寄せて病原菌の細胞膜溶解を促進したりするなど（補体依存性細胞傷害活性、CDC 活性）、ほかの免疫システムとも密に連携して免疫反応を惹起している。

抗体の構造は、重鎖と軽鎖という 2 種類のポリペプチドそれぞれ 2 本からなる Y 字型の四量体である。ポリペプチド分子間で複数のジスルフィド結合が形成することで、体液中でも非常に安定に存在できる。抗体分子は、抗原と実際に相互作用する「可変領域」と、分子構造安定性に寄与する「定常領域」に分けることができる。さらに、タンパク質分解酵素であるパパインの消化部位を基準として、可変領域を含む「Fab 領域」とそれ以外の「Fc 領域」に分けることもできる（図 1-1）。

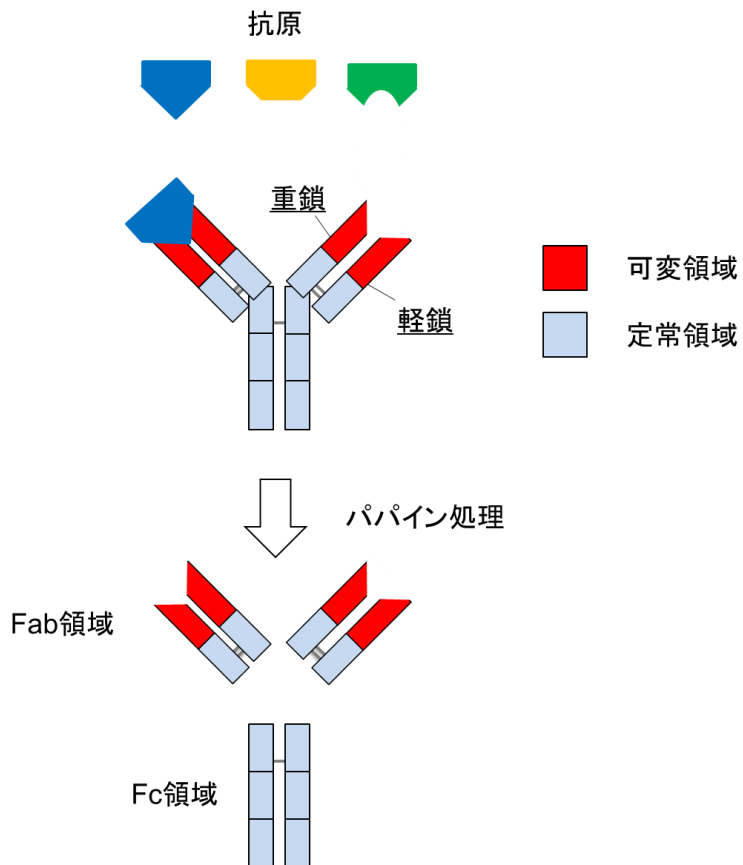


図 1-1 標準的な抗体の構造模式図

抗体は重鎖と軽鎖の2種類のポリペプチドからなるY字型をしたタンパク質である。抗原結合部位であるN末端側の可変領域と、C末端側の定常領域に大きく分けられる。またパパイン消化部位を基準として、Fab領域とFc領域にも分けられる。なお、ここでは標準的な抗体構造を有するIgGアイソタイプの様式図を示した。

1-1-2 抗体の多様性獲得と体細胞遺伝子再編成

真核生物が子孫を継承する際には、卵や精子といった生殖細胞を作り出す減数分裂を経る。この過程で細胞の染色体セット数が半減するが、多くの生物ではこの際に両親に由来する染色体（相同染色体）同士で、対合と遺伝的組換えを起こす。減数分裂期に活性化される遺伝的組換えでは、「組換えホットスポット」と呼ばれる染色体の部位で、計画的な DNA 切断とそれに引き続く相同組換え反応が引き起こされ、この過程を通じて子孫世代の遺伝的多様性が確保される。

一方で、多細胞生物の体細胞では、相同組換えなどの遺伝的組換え反応は極力抑制されている。これは複雑な多細胞生物の場合、反復性の DNA 配列が多く含まれてため、体細胞において DNA 組換えが活性化されることで、染色体転座などの染色体再編成が誘発される可能性があるからと考えられている。染色体再編成は発がんなどに結びつくことが知られており、組換え（とくに相同組換え）を体細胞で抑制することが、多数の細胞を個体組織に有する生物の安定的な生存を保証している。

脊椎動物において例外的に DNA 組換えが活性化される細胞群がある。獲得免疫を担う B 細胞や T 細胞である。これらの細胞では、抗原受容体の遺伝子座において限定的に DNA 組換え反応を行うことで、高度な免疫システムを確立している。例えば抗体遺伝子の定常領域では、「クラススイッチ」と呼ばれる組換え反応によって、産生する抗体アイソタイプを変更している(Muramatsu *et al*, 2000)。活性化前の B 細胞は IgM または IgD 型の抗体を発現しているが、抗原刺激が伝わるとクラススイッチが進行し、成熟 B 細胞として IgG、IgA、IgE 型の抗体を発現するようになる。ヒト体液中に存在する抗体のうち 7 割以上が IgG 型の抗体であることから、生体防御において組換え機構を利用した IgG 型抗体へのクラススイッチが重要であると考えられる。

また、抗原との直接の相互作用部位である可変領域においても、積極的な組換え反応により配列を多様化することで、無数に存在する抗原に対応可能な抗体遺伝子のレパートリーが確立される。この抗体遺伝子の再編成としては、ヒトやマウスでは、「V(D)J 組

換え」と呼ばれる機構が利根川進らによりはじめて解明された(Tonegawa, 1983)。その後の詳細な研究により、V(D)J 組換えが転移性因子であるトランスポゾンの DNA 転移酵素によく似た部位特異的組換え酵素「RAG1/RAG2 (Recombination Activation Gene) 複合体」によって引き起こされることが明らかになった(Oettinger *et al*, 1990)。重鎖の場合、可変領域には V 断片、D 断片、J 断片がそれぞれ複数個、並列に配置されていて、V(D)J 組換えの際にランダムにこれらの中から断片が選択され、可変領域配列の多様性が確保される。例えば、V 断片が 60 種類、D 断片が 30 種類、J 断片が 3 種類だとすると、重鎖だけでも $60 \times 30 \times 6 = 10,800$ の配列多様性を生み出すことができる。また軽鎖には κ 鎖と λ 鎖があり、それぞれについて V 断片と J 断片が存在し、さらには V(D)J 組換えの接合部で塩基付加が起きるため、V(D)J 組換えによって抗体遺伝子可変領域には膨大な多様性が生み出される。

一方、鳥類やウサギ、大型の家畜哺乳類などでは、V(D)J 組換えに加え「遺伝子変換」と呼ばれる相同組換えの一種が、抗体遺伝子の多様化に重要な役割を果たすことが明らかにされている (図 1-2) (Reynaud *et al*, 1985)。これらの生物種の抗体遺伝子座では、一度の V(D)J 組換えにより機能的な可変領域が一つ生じるが、これだけではヒトやマウスのような多様性は生じず、その後に行われる遺伝子変換が多様性獲得の大部分を担う。これらの生物では、抗体遺伝子上流に、可変領域によく似た配列の、それぞれが異なる「偽遺伝子」が並列に多数配置されている。これらの偽遺伝子は配列が部分的でかつ発現もしないため、遺伝子としての機能を持っていない。これらの生物のある種の免疫器官 (鳥類ではファブリキウス嚢) の分化段階にある B 細胞において、偽遺伝子の配列を鋳型として、機能的な可変領域遺伝子を受け手とする相同組換えが継続して起こる。この際に、偽遺伝子の配列は変化しない。すなわち一方向的な「コピー&ペースト」型の相同組換えが起こる。この遺伝子変換が可変領域で継続的かつ限定的に起こることにより、十分な抗体多様性が確保される。

V(D)J 組換えや遺伝子組換えによって多様な抗体遺伝子レパートリーを形成した B 細

胞集団において、さらに抗体遺伝子可変領域限定的な点突然変異が誘発される。これを体細胞高頻度突然変異（SHM: Somatic Hypermutation）という(Li *et al*, 2004)。メカニズムとしては脱アミノ化酵素である AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) によるシチジンからウラシルへの変換で塩基不和合（ミスマッチ）が生じ、このミスマッチ修復の際に変異が導入されるとされている。この機構は「親和性成熟」と呼ばれ、成熟 B 細胞が初期免疫時に比べてより高い抗原親和性を有する抗体を発現するために重要な役割を果たす。

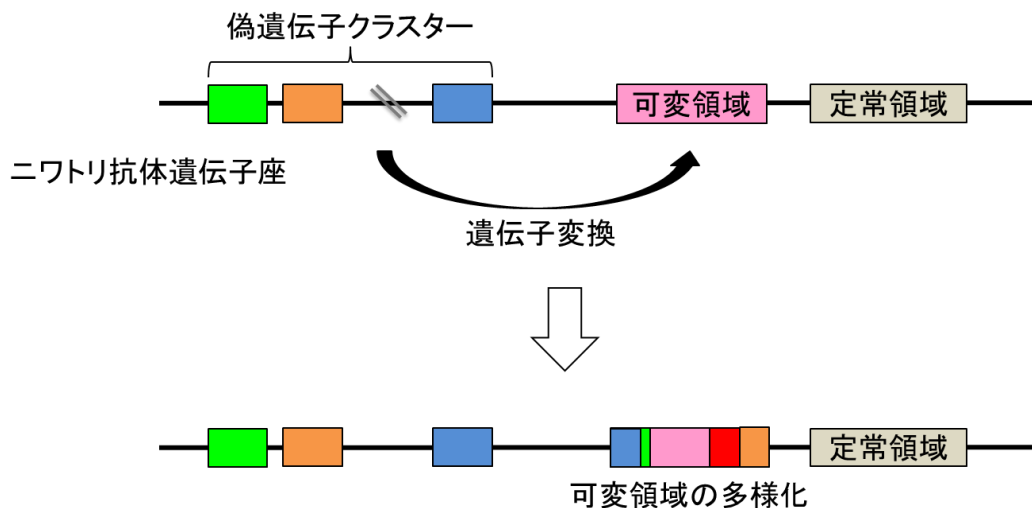


図 1-2 遺伝子変換による抗体遺伝子多様化

ニワトリ抗体遺伝子座を例に遺伝子変換の概略を模式図で示した。抗体遺伝子上流に存在する偽遺伝子を鋳型とした一方向性の相同組換えによって、抗原結合部位である可変領域の遺伝子は多様性を獲得している。

1-1-3 モノクローナル抗体作製技術

抗体はその抗原認識能力の高さゆえ、診断や研究においてターゲット検出のための重要なツールであり、今までに数多くの抗体作製技術が報告されてきた。古くから行われている方法は、免疫刺激を与えた動物の血清を回収して抗体を得る方法である。こうして得られる抗体は「ポリクローナル抗体」と呼ばれ、同一の抗原に対して異なるエピトープ認識能を持つ抗体集団である。

一方、ポリクローナル抗体と対比される抗体種に「モノクローナル抗体」がある。モノクローナル抗体は、単一の細胞クローンに産生させることによって無制限に合成可能な抗体であり、分子組成としても抗原認識能の点でも非常に均質性が高く、医薬品などとしての品質管理が容易である。そこで近年、モノクローナル抗体を医薬品として応用するための研究開発が盛んに行われている(Ecker *et al*, 2015)。

モノクローナル抗体作製技術の歴史は約 40 年前の「ハイブリドーマ法」の発明に遡る(Köhler & Milstein, 1975)。ハイブリドーマ法はまず免疫刺激を与えた動物から B 細胞を取得するが、このままでは細胞を維持することができない。そこで無限増殖能を有するミエローマがん細胞と細胞融合させることで B 細胞を不死化する。不死化した B 細胞集団の中から標的抗原に結合する抗体を発現するハイブリドーマを選抜することで、モノクローナル抗体産生細胞クローンを取得することができる。

ハイブリドーマ法の欠点としては、B 細胞取得の際に動物の免疫システムを利用しているために、免疫する動物に元々存在しているような、免疫原性が低いタンパク質や糖鎖、脂質などの自己抗原に対する抗体を作製することが難しいことが挙げられる。この「免疫寛容」の問題を打開するために、ファージやリボソーム、酵母などに抗体様タンパク質を提示させることで抗体を作製する試験管内抗体選抜技術が開発された(Hoogenboom, 2005; Bradbury *et al*, 2011)。これらの中で最も実績の多いファージディスプレイ法では、まず抗体の重鎖可変領域遺伝子と軽鎖可変領域遺伝子を一本につなげた scFv (single chain Fv) や Fab の形でライブラリ化したものを、ファージに提示させ

た「ファージライブラリ」を作製する(Marks *et al*, 1991)。このファージライブラリを、標的分子を固定したプレートと反応させたのち非結合性のファージを洗い流すことで、標的分子結合性のファージだけを濃縮する (バイオパンニング)。濃縮したファージは大腸菌に感染、増殖させることで二次ライブラリを作製することができる。以上のバイオパンニング操作を 3~5 回繰り返すことで、標的分子に強く結合する抗体様タンパク質を探し当てることができる。さらにファージに提示されたタンパク質の遺伝子情報はファージゲノムに格納されているので、それを読み取ることでリコンビナントタンパク質を得ることも可能である。

1-1-4 抗体医薬と抗体のヒト化および高機能化技術

前述の通り、近年抗体を医薬品として活用する「抗体医薬」が注目されている。この潮流の中で多くのモノクローナル抗体作製技術が開発されてきた一方で、遺伝子工学手法の発展に伴い、作製した抗体を改変・高機能化する抗体エンジニアリングの分野も著しい隆盛を見せている(Chan & Carter, 2010)。

抗体エンジニアリングの分野は抗体医薬の研究開発と共に発展してきた。北里柴三郎の開発した血清療法に端を発し、「抗体を疾患の治療薬として活用する」というアイデアは古くからあったが、抗体が医薬品として初めて米国で認可されたのは 1990 年代になってからである。この開発の遅滞は、マウス等の動物で作製した抗体をヒトに投与した場合、抗原性が出てしまうことが最大の要因であった。

遺伝子工学の発展により、遺伝子組換えによって作製した抗体をヒト由来のものに近づけ、リコンビナントタンパク質として発現できるようになったことが、抗原性の問題解決に非常に大きく貢献した。世界で初めて認可された抗体医薬「リツキサシ」(抗 CD20 抗体)は、マウス・ハイブリドーマ抗体の Fc 領域をヒト IgG の Fc 領域に入れ換えヒト IgG キメラ抗体にすることで、免疫原性の問題を克服した。

その後、定常領域だけでなくフレームワーク領域 (FR: Framework Region) をもヒト化した「ヒト化抗体」が報告された。これは、可変領域の中で抗原と直接相互作用するとされる相補性決定領域 (CDR: Complementarity-Determining Region) をヒト抗体遺伝子に埋め込むという「CDR グラフティング」の技術によって達成され(Jones *et al*, 1986)、さらなる免疫原性の低減に貢献した。最近では、相補性決定領域を含めた抗体全体をヒト抗体の配列で構成する「完全ヒト抗体」が作製できる技術も確立されている。

このように、抗体のキメラ化、ヒト化さらに完全ヒト抗体といった技術は免疫原性の課題を解決する上で極めて重要であるが、一方で高い治療効果を得るために抗体医薬を高機能化するための研究開発も非常に盛んである。抗体医薬の主な作用機序としては下記の 4 種類に大別される。

1) アンタゴニスト活性：

抗体がターゲットに結合することでターゲットの機能を弱める活性。いわゆる中和活性。例えば受容体に結合することで本来のリガンドの結合を阻害し、シグナル伝達を阻害するような抗体がある。

2) アゴニスト活性：

抗体が受容体に結合することで、本来のリガンドが受容体に結合した場合と同様のシグナル伝達を惹起する活性。

3) 細胞傷害活性：

がん細胞などに抗体が結合することで、免疫細胞や補体によるがん細胞の殺傷を誘導する活性。詳細は後述する。

4) 抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate ; ADC)：

抗体と薬剤を共役させ、抗体が結合したがん細胞などを薬剤の効果により殺傷する抗体。詳細は後述する。

抗体医薬開発の黎明期は、上記の1) や2) の作用機序を期待して、まずハイブリドーマ抗体作製し、それをヒト IgG キメラ化あるいはヒト IgG 化していた。しかし、世界中で様々な抗原に対する抗体開発が行われた結果、現在では有望な抗原を見出すのが困難になってきている。

一方、抗体の主に Fc 領域を改変することで3) や4) の作用機序をうまく利用し、薬効を強化する新たな技術が開発されつつある。こうした Fc 領域の改変技術は Fc エンジニアリングと呼ばれており、既存の抗体の薬効増強や、今までは薬効が不十分だったために有望な抗原とならなかったものが新薬ターゲットになるなど、抗体医薬の可能性を広げることが期待されている。

まず Fc エンジニアリングによる細胞傷害活性(上記3) の増強であるが、細胞傷害性細胞は膜表面に Fc 受容体を発現しており、抗原に結合している抗体の Fc 領域を認識す

ることで、ADCC 活性が惹起され病原菌やがん細胞を殺傷する (図 1-3)。近年の研究では、Fc 領域への変異導入や糖鎖修飾の改変により Fc 領域に対する Fc 受容体の親和性を改善することで、ADCC 活性を強化することに成功したという報告がなされている (Shields *et al*, 2001; Lazar *et al*, 2006; Richards *et al*, 2008; Smith *et al*, 2012)。Fc 領域の改変によって ADCC 活性以外にも、CDC 活性を強化したり (Idusogie *et al*, 2001)、生体内での抗体の分解を抑制したりすることで (Igawa *et al*, 2010)、薬効を最大化するための取り組みがなされている。

次に ADC (上記 4) であるが、これは細胞毒性などを有する低分子化合物を結合させた抗体である。抗体だけでは不十分だったがん細胞殺傷能力を低分子化合物で補い、一方で全身毒性が問題となる低分子化合物の非特異性という欠点を、抗体の抗原特異性で補うもので、新しい抗体医薬技術として近年非常に注目されている。薬剤は抗体分子中のリジンやシステイン残基に対して、共有結合によって共役させることが一般的である (Wu & Senter, 2005)。しかし、共役位置を指定できないために、可変領域に共役してしまうことで抗原結合性が失われたり、抗体に対する薬剤の存在比 (DAR; Drug Antibody Ratio) が不均一になってしまったりするなどの懸念がある。そこで最近、定常領域の特定の場所にシステイン残基を導入したり (Junutula *et al*, 2008)、非天然アミノ酸を導入したりすることで (Axup *et al*, 2012)、共役反応を制御し均質な ADC を作製するために技術が開発されている。

一方、抗体高機能化において、Fc 改変や機能付加とともに重要な技術として、抗原親和性強化技術が挙げられる (Hoogenboom, 2005)。ハイブリドーマ法などによって抗原結合能を有する抗体が作製できても、親和性が不十分なために期待した機能を発揮できない抗体医薬が存在する。抗体の高親和化においても、ファージディスプレイが最も広く利用されている。抗体遺伝子をクローニング、エラープロンポリメラーゼ等によりランダムに変異を加えた上でファージライブラリを作製することで、その中から高親和性の scFv を選抜することができる (Marks *et al*, 1991)。

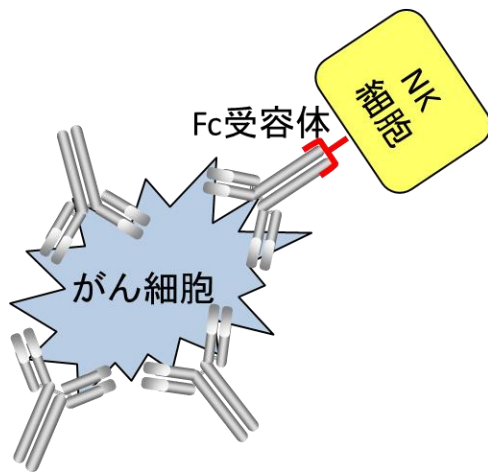


図 1-3 ADCC 活性の概略

NK 細胞などの細胞傷害性細胞は Fc 受容体を発現しており、抗原に結合している抗体の Fc 領域を介して標的を認識し殺傷する。

1-1-5 従来の抗体エンジニアリング技術の課題

現在でもモノクローナル抗体作製の主流はハイブリドーマ法であるが、免疫寛容の問題だけでなく、動物免疫過程や標的分子に結合するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング過程には多大な時間と労力が必要であり、最終的な細胞株の樹立までには 3 か月以上を要する。

一方、各種ディスプレイ法の発明により、試験管内でライブラリを準備することで動物免疫の手間を省くことができた。しかし、ファージやリボソームが発現できるのは抗体の一部 (scFv や Fab) に限られ、最も安定かつ応用範囲の広い IgG 型等の形で発現させるためには、抗体遺伝子をクローニングした上で、別の培養細胞にリコンビナントとして発現させる必要がある。その過程で、ディスプレイ法で得られた抗原結合性が低下したり、失われたりするケースも存在する。理由としては、定常領域と繋げた時のコンフォメーションの変化や、分泌過程におけるフォールディング障害が指摘されている (Akamatsu *et al*, 2007)。また抗体は糖タンパクゆえ、ディスプレイ法では糖鎖修飾されていなかった抗体が培養細胞内で糖鎖修飾を受けることで、機能が変化してしまう可能性も考えられる。以上の課題を考慮すると、重鎖と軽鎖で構成される抗体を発現させた試験管内選抜システムがあれば、非常に理想的である。

また Fc エンジニアリングによる抗体の高機能化技術という観点では、より効率的に薬効を発揮するための Fc 変異の探索や、ADC 作製のための薬剤共役技術などの開発が行われてきているものの、実際に Fc 領域を改変した抗体を作製するには PCR 等で Fc 領域を入れ換えた抗体遺伝子を作製し、一つ一つ培養細胞に導入して発現させなければならず、膨大な手間と時間を要するのが現状である。さらに抗体の高親和化の観点では、ファージディスプレイの利用が一般的であるが、ファージ自体には変異を導入する機構を有していない。つまり、高親和化実験のたびにファージライブラリを構築しなければならず、そのための抗体遺伝子ライブラリの準備や良質なファージライブラリを作製するための条件検討などは大きな手間となる。

このように、抗体作製、Fc エンジニアリング、親和性向上いずれのプロセスにおいても従来技術それぞれに課題を内包している。そこで、これらすべてを迅速に、それも同一の細胞内で連続的に行えるような系が存在すれば、抗体医薬開発はもちろん、診断薬開発や試薬としての抗体作製に大きく貢献できると考えられる。

1-2 所属研究室における研究背景

1-2-1 DT40 細胞

DT40 細胞は、ニワトリ白血病ウイルスでがん化することによって樹立された、ニワトリ B 細胞由来の培養細胞である(Buerstedde *et al*, 1990)。DT40 細胞は、高等生物由来の細胞では例外的に遺伝子ターゲティング効率が高いこと (約 50%)、低いレベルではあるが、遺伝子変換による抗体遺伝子多様化機構活性を有していること(Arakawa & Buerstedde, 2004)、増殖速度が極めて速いこと (約 8 時間で倍加) が特長であり、逆遺伝学実験、特に相同組換えや DNA 修復の研究に広く利用されてきた。また、分泌型抗体と膜型抗体の両方を同時発現している点も特徴的である。

1-2-2 クロマチン構造を介した抗体遺伝子再編成の制御

真核生物ではクロマチン構造と呼ばれる凝集体を形成することによって、核内にゲノムを収納している。近年の知見では、クロマチン構造の凝集と弛緩によって、遺伝子発現のパターンが決定されていると考えられている。クロマチン構造の決定に最も大きく寄与しているものの一つが「ヒストン修飾」である。ヒストンは、クロマチン構造の最小単位であるヌクレオソームを形成するために、DNA を巻き付けるためのコアタンパク質である。ヒストンの N 末端に存在するテール領域のアミノ酸残基がアセチル化、メチル化などの修飾を受けることによって、クロマチン構造が変化し遺伝子発現が制御されている。

さらに、ヒストン修飾によるクロマチン構造変化が、転写制御だけでなく DNA 組換えの制御にも関与していることが報告されている。例えば、V(D)J 組換えの制御や T 細胞受容体の再編成において、ヒストン修飾が重要な役割を果たすことが示唆されている (McMurry, 2000; Agata *et al*, 2001)。

所属研究室では、DT40 細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) で処理することで、抗体遺伝子座のヒストンアセチル化状態が亢進し、遺

伝子変換が著しく活性化することを発見した(Seo *et al*, 2005)。さらに同じく所属研究室の研究成果として、ヒストン脱アセチル化酵素である HDAC1 や HDAC2 を欠損させることでも遺伝子変換の頻度が上昇することがわかっている(Lin *et al*, 2008; Kurosawa *et al*, 2010)。

1-2-3 DT40 細胞を利用した試験管内モノクローナル抗体作製技術 (ADLib システム)

上述のように、TSA 処理により DT40 細胞の抗体遺伝子多様化を促進できることを利用して、所属研究室では、試験管内でモノクローナル抗体を作製する技術 (Autonomously Diversifying Library; ADLib システム) を開発した (図 1-4) (Seo *et al*, 2005, 2006)。ADLib システムではまず始めに、DT40 細胞を TSA 処理条件で数週間培養することで遺伝子変換を促進し、それぞれの DT40 細胞膜上に異なる抗体を提示させる (抗体ライブラリ)。次に、抗原を固定した磁気ビーズと混合することで、磁力によって候補となる DT40 細胞を選別する。最終的には、培養上清を用いた抗原特異性検定を行ったのち、標的抗原に対するモノクローナル抗体産生細胞を樹立する。

ADLib システムは、ライブラリ構築のプロセスが薬剤添加した培地による培養だけで非常に簡便であること、そして、抗体取得にかかる時間が 1~2 週間と短くて済むことが長所として挙げられる。ほかの試験管内抗体選抜技術と同様、標的抗原選択において自由度が高く、これまでに多くのモノクローナル抗体作製実績がある(Omi *et al*, 2015; Yamashita *et al*, 2015; Guy *et al*, 2015)。

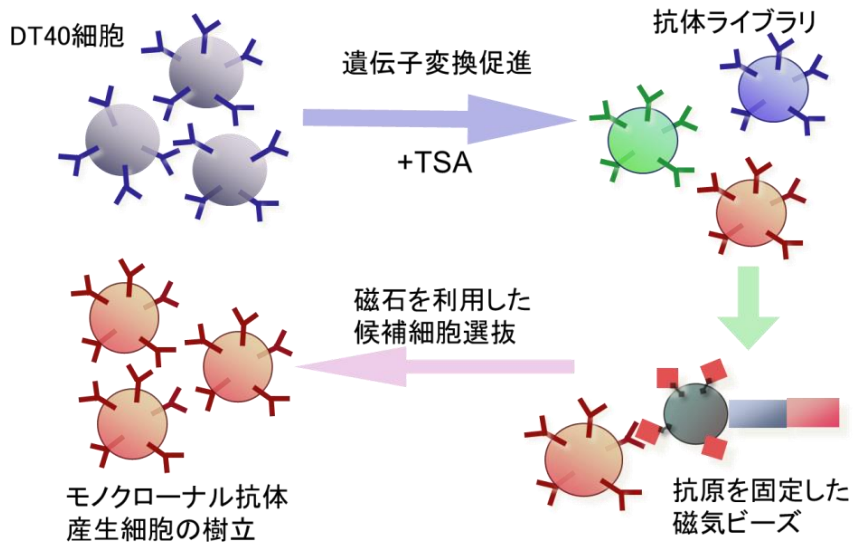


図 1-4 ADLib システムによるモノクローナル抗体作製の概略

ADLib システムでは、TSA 処理によって抗体ライブラリを作製する。ライブラリに対して抗原を固定した磁気ビーズと混合することで、磁力によって細胞を選抜する方法でクローン化を行い、モノクローナル抗体産生細胞を樹立する。

1-2-4 抗体遺伝子編集によるヒトキメラ抗体作製技術

ADLib システムの課題の 1 つとして、野生型の DT40 細胞が発現する抗体アイソタイプがニワトリ IgM 型であることが挙げられる。抗体分子の安定性や抗体医薬への応用を考えると、最初から DT40 細胞にヒト IgG 型抗体を発現させることが望ましい。そこで所属研究室では、遺伝子ターゲティング手法を利用して DT40 細胞抗体遺伝子座にヒト IgG1-Fc 遺伝子を導入することで、ヒト-ニワトリキメラ型のモノクローナル抗体を作製することに成功した(Lin *et al*, 2011)。

1-2-5 Cre/loxP 系を用いた抗体 Fc 領域の迅速改変

上記の先行研究により、DT40 細胞にヒトキメラ抗体を発現させることに成功した。しかし、細胞株構築にあたり、抗体 Fc 領域遺伝子座の編集効率の低さが明らかになった。DT40 細胞の場合、通常のターゲティング効率は 50%程度とされているが、Fc 領域においては 1%以下であった。まず前提として、標準的な逆遺伝学の実験であっても、エレクトロポレーション後に DT40 細胞クローンを得るために約 1 週間かかり、さらにターゲティング陽性を確認するためにジェノタイピングの労力を必要とする。今回のように遺伝子編集効率が低く、ターゲティング陽性株が得られなかった場合、上記のクローン化およびジェノタイピングの実験を繰り返さなければならず、時間と労力がかかってしまうことが懸念された。

そこで近年、抗体 Fc 領域遺伝子座に Cre/loxP 系を適用した技術が開発された (黒澤恒平博士論文、2013)。Cre/loxP 系は、Cre リコンビナーゼとその標的配列である loxP 配列を利用した部位特異的組換え系である。

特に本技術では、Cre リコンビナーゼ発現依存的に遺伝子カセットを置換するための遺伝子工学的手法(Recombinase-Mediated Cassette Exchange: RMCE 法)(Turan *et al*, 2011)を DT40 細胞の抗体遺伝子領域に応用した (以下、Cre-In システム)。図 1-5 に Cre-In システムの概略を示す。Cre-In システムにおいて置換対象となるカセット (以下、

Cre-In カセット) の基本構成は、抗体遺伝子と薬剤耐性遺伝子であり、この 2 つの遺伝子を Cre リコンビナーゼ認識配列である loxP 配列、lox2272 配列で挟むことで RMCE が可能となる。まず第 2 章 2-3-1 項に示した遺伝子ターゲティング法を利用して抗体遺伝子座に Cre-In カセットを導入する。Cre-In システムを動作させる際には、同様の loxP 配列、lox2272 配列に挟まれた配列を持つドナーベクターを Cre リコンビナーゼ発現プラスミドと共に導入する。その際、遺伝子ターゲティングの時とは違う薬剤耐性遺伝子を持つドナーベクターを導入することで、薬剤処理によって Cre-In カセットが置換された細胞だけが生き残る。すなわち、薬剤処理後に得られる細胞集団はすべて改変型抗体を発現するようになる。なお、lox2272 配列は loxP 配列の変異体であり、RMCE 時に loxP 同士が繋がることでカセットが脱落することを防いでいる(Lee & Saito, 1998)。

Cre-In システムを抗体 Fc 領域遺伝子座に導入した結果、ほぼ 100%の確率で Fc 領域を改変できるようになった (黒澤恒平博士論文、2013)。

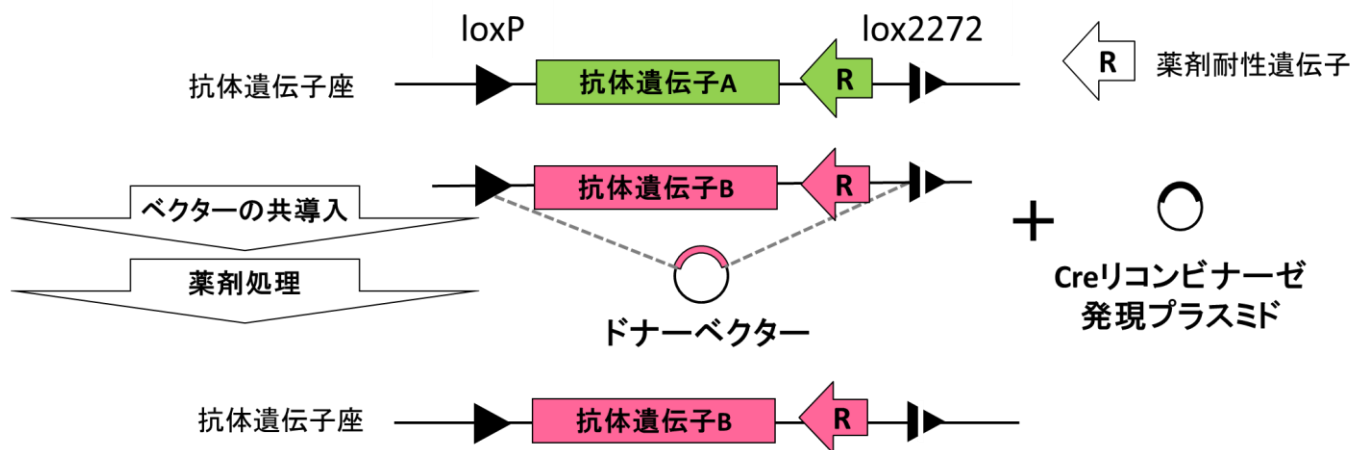


図 1-5 Cre-In システムの概略

Cre-In システムは、抗体遺伝子と薬剤耐性遺伝子を組み合わせ、loxP 配列と lox2272 配列で挟むことで、Cre リコンビナーゼ発現依存的に抗体遺伝子を置換するシステムである。ドナーベクターと Cre リコンビナーゼ発現プラスミドを共導入した後に薬剤処理することで、抗体遺伝子の置換された DT40 細胞のみが生き残る。

1-2-6 研究課題

1-2-5 項の先行研究を受けて私は、DT40 細胞を利用した Fc エンジニアリングを実施するための基盤技術を構築することを研究課題として設定した。しかし、課題を達成する上で、従来の Cre-In システムには大きな問題があった。

従来型 Cre-In システムの課題を説明するために、ここでは DT40 細胞の重鎖抗体遺伝子座を詳細に記述した上で議論する。まず始めに、野生型のニワトリ抗体重鎖遺伝子座とその転写産物の模式図を示した(図 1-6)。重鎖定常領域は 4 つのエキソン($\mu 1$ 、 $\mu 2$ 、 $\mu 3$ 、 $\mu 4$)で構成され、そのうちの 3 つのエキソン($\mu 2$ 、 $\mu 3$ 、 $\mu 4$)で Fc 領域が構成されている(Lin *et al.*, 2011)。重要な点として、DT40 細胞は選択的スプライシングにより、膜型と分泌型、2 種類の IgM 型の抗体を同時に発現している点が挙げられる(Arakawa & Buerstedde, 2004)。

次に、従来型 Cre-In システムの「ニワトリ-ヒトキメラ抗体遺伝子座」とその転写産物の模式図を示した(図 1-7)。従来型 Cre-In システムでは、野生型のニワトリ IgM-Fc 遺伝子を「ノックアウトせずに」Cre-In カセットを導入している。これにより従来型 Cre-In システムは、分泌型ヒトキメラ抗体だけでなく、分泌型および膜型のニワトリ IgM 型抗体を発現している。なお、ニワトリ IgM 型抗体の発現を維持させた目的は、膜型のニワトリ IgM 型抗体を利用して ADLib システムを実施するためである。

このように、従来の Cre-In システムではニワトリ-ヒトキメラ抗体の分泌には成功したものの、一方でニワトリ IgM 型抗体を維持したことが、本技術の実用性の障害になりうる点を内包していることが分かった。1 点目は「膜型」ニワトリ IgM 型抗体の問題である。IgM 型抗体と IgG 型抗体では、構造上の大きな違いがあるため、同じ抗原特異性を持つとは限らない。すなわち、IgM 型抗体でセレクションを行った細胞から得られたヒトキメラ IgG 抗体は、その構造安定性が不十分で、特異性が変化してしまうケースが生じることが懸念される。

2 点目は「分泌型」ニワトリ IgM 型抗体の問題である。まず、分泌型抗体としてヒト

キメラとニワトリ IgM の 2 種類が発現しているため、本来必要であるはずのヒトキメラ抗体の総量が少なくなってしまう。さらに、IgM 型抗体は五量体を形成しているため、IgG 型抗体に比べ、分子全体としての親和性（アビディティ）が高い。例えば培養上清を用いた ELISA を行うとすると、アビディティの高い IgM がヒトキメラ抗体と競合する形になるため、ヒトキメラ抗体の機能を検出が困難になることが懸念される。以上の観点から、従来型 Cre-In システムは様々な Fc 配列を試すことを想定している Fc エンジニアリングにおいては実用上の問題があった。

そこで本博士論文の第 3 章では、上記の問題を解決した改良型 Cre-In システムを開発した（図 1-8、ターゲティングベクター等の詳細は第 3 章の図 3-1A 参照）。まず、遺伝子ターゲティングの際にニワトリ IgM-Fc 遺伝子の一部（図中の $\mu 2$ エキソン）をノックアウトした。しかし、ノックアウトしただけでは抗体セレクションに必要な不可欠な膜型抗体が消失してしまう。そこで、Cre-In カセット内に膜型抗体ドメインを挿入することで、膜型のヒトキメラ抗体を発現させるように設計した。第 3 章の前半では、実際に上記の工夫を反映した Cre-In システムを導入した細胞株（以下、Cre-In システム搭載細胞）を樹立することに成功した。そして後半では、Cre-In システム搭載細胞を利用したいくつかの Fc エンジニアリングの応用事例を報告する。

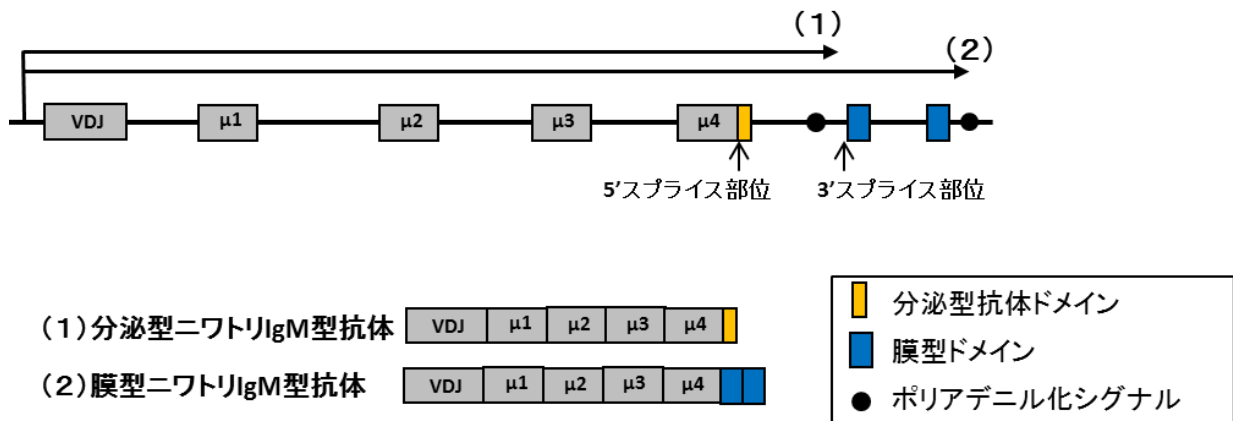
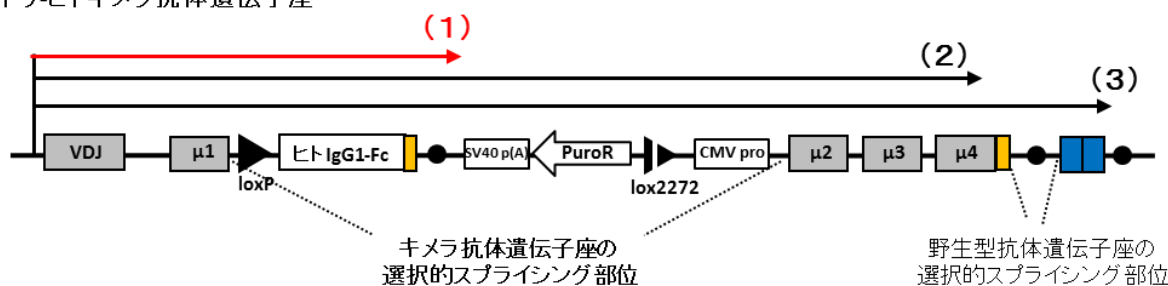


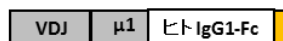
図 1-6 野生型ニワトリ抗体重鎖遺伝子座とその転写産物の模式図

各エクソンをボックスで示した。膜型抗体ドメインは2つのエクソンで構成されており、スプライシングを受けることによって、成熟したドメインとなる。また、選択的スプライシング機構によって、矢印で示した部位でスプライシングが起こることで、1つの抗体遺伝子座から分泌型抗体と膜型抗体の2種の mRNA が発現する。

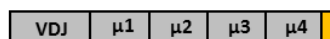
ニワトリ-ヒトキメラ抗体遺伝子座



(1) 分泌型ヒトキメラ抗体



(2) 分泌型ニワトリIgM型抗体



(3) 膜型ニワトリIgM型抗体

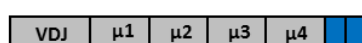
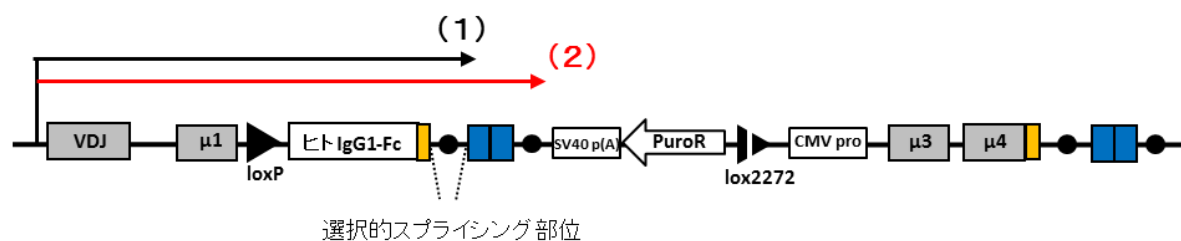


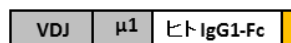
図 1-7 従来型 Cre-In システムの詳細とその転写産物の模式図

野生型のニワトリ IgM-Fc エキソンを潰さずに、イントロン領域に Cre-In カセットを導入した。これにより、元々の選択的スプライシングに加えて、Cre-In カセットをスキップするようなスプライシングが顕れる。結果として、1つの抗体遺伝子座から分泌型ヒトキメラ抗体、分泌型ニワトリ IgM 型抗体、膜型ニワトリ IgM 型抗体の3種の mRNA が発現する。

ニワトリ-ヒトキメラ抗体遺伝子座



(1) 分泌型ヒトキメラ抗体



(2) 膜型ヒトキメラ抗体

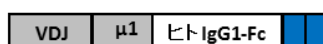


図 1-8 改良型 Cre-In システムの詳細とその転写産物の模式図

野生型のニワトリ IgM-Fc エキソンを潰すのと同時に、Cre-In カセット内に膜型ドメインを導入した。結果として、1つの抗体遺伝子座から分泌型ヒトキメラ抗体および膜型ヒトキメラ型抗体の2種の mRNA が発現する。

第 3 章

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

3-1 Cre-In システム搭載 DT40 細胞株の構築

Cre-In システム搭載細胞を樹立するために、まずはニワトリ IgM-Fc をヒト IgG1-Fc に変換するターゲティングベクターを設計した。図 3-1A に、作製したターゲティングベクターと遺伝子ターゲティング後の「ニワトリ-ヒトキメラ抗体遺伝子座」を示す。ターゲティングベクター p2.2-hIgG1 は、ヒト IgG1-Fc 遺伝子の下流に、その遺伝子とは逆の方向に、CMV プロモーターで制御されるピューロマイシン耐性遺伝子を配置している。また、細胞株の樹立後に Cre-In カセット置換を実施することを想定して、ヒト IgG1-Fc 遺伝子上流に loxP 配列を、ピューロマイシン耐性遺伝子と CMV プロモーターの間に lox2272 配列をそれぞれ挿入している。さらに、相同組換えによるターゲティングを行うために、loxP 配列の外側に約 3 kbp に渡るニワトリ IgM 定常領域との相同配列を配置した。その際に、ニワトリ IgM 型抗体をノックアウトする目的で $\mu 2$ エキソンを破壊するように相同配列を選択した。一方で、新たに膜型抗体ドメインを導入することで、膜型および分泌型の「ヒトキメラ抗体のみ」を発現させるようにした。構築したターゲティングベクターは、第 2 章 2-3-1 項に示した遺伝子ターゲティング法で野生型の DT40 細胞に導入した。形質転換後、選抜薬剤であるピューロマイシンを添加し、96 穴プレートに播種することで、薬剤耐性を有する DT40 細胞株を得た。

得られた計 261 株の薬剤耐性 DT40 細胞株に対して、ターゲティングに成功した「Cre-In システム搭載細胞株」のスクリーニングを行った。スクリーニングは、各候補クローンの培養上清を用いたドットブロットにより、ヒト IgG1 キメラ抗体の発現を確認することで行った。(図 3-1B)。その結果、2 つの Cre-In システム搭載細胞株を得ることが出来た。このうち生育が良好だった 1 株について、ドットブロット、FACS、RT-PCR により、ヒトキメラ IgG1 抗体の発現状況の詳細な解析を行った(図 3-1C)。その結果、膜型抗体と分泌型抗体共に、ニワトリ IgM 型抗体の発現が消失し、ヒトキメラ抗体が発現していることを確認した。

ターゲティングベクター (p2.2-hIgG1)

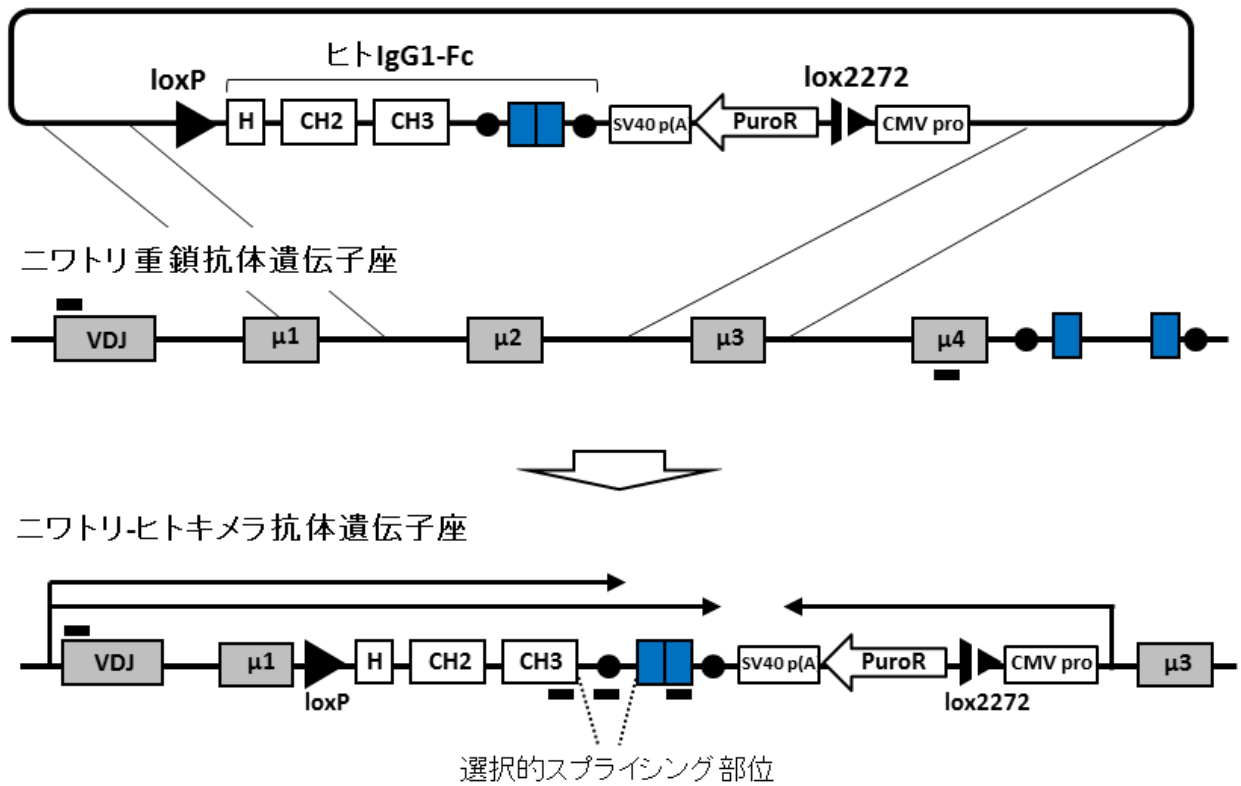


図 3-1A Cre-In システム搭載細胞構築の概略

ニワトリ重鎖抗体遺伝子座にヒト IgG1-Fc 遺伝子をターゲティングするためのベクターp2.2-hIgG1 を作製した。p2.2-hIgG1 では、ヒト IgG1-Fc の方向とは逆向きにピューロマイシン耐性遺伝子を発現させた。Cre-In システムを動作させるためのマーカーとして、ヒト IgG-Fc の上流に loxP 配列を、ピューロマイシン耐性遺伝子とそのプロモーターの間に lox2272 配列を配置した。さらに選択的スプライシングを利用して、分泌型ヒトキメラ抗体及び膜型ヒトキメラ抗体を同時に発現させるために、ヒト IgG1-Fc の下流に、ポリアダニル化シグナルと膜型ドメインの cDNA を配置した。なお、抗体遺伝子座の上下に示されている黒線は、図 3-1C の RT-PCR 解析で使用したプライマーのアニーリング部位を示す。

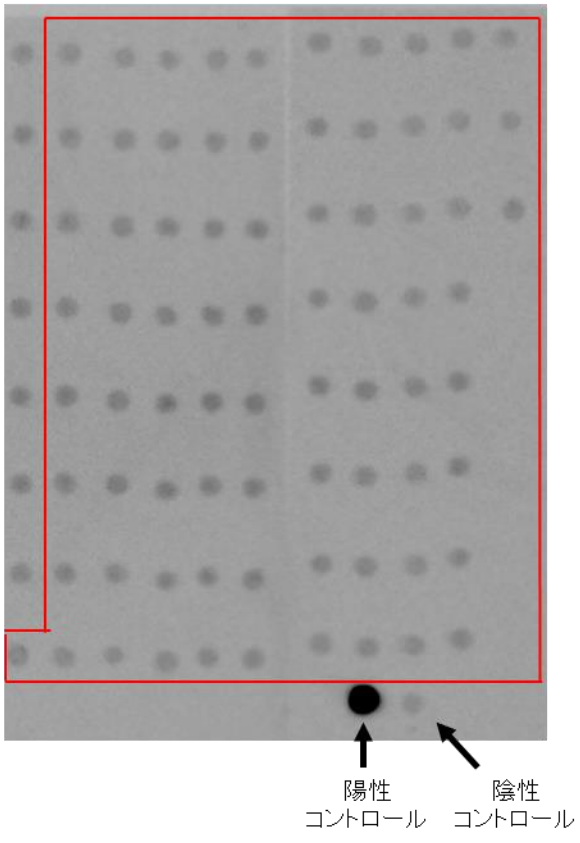
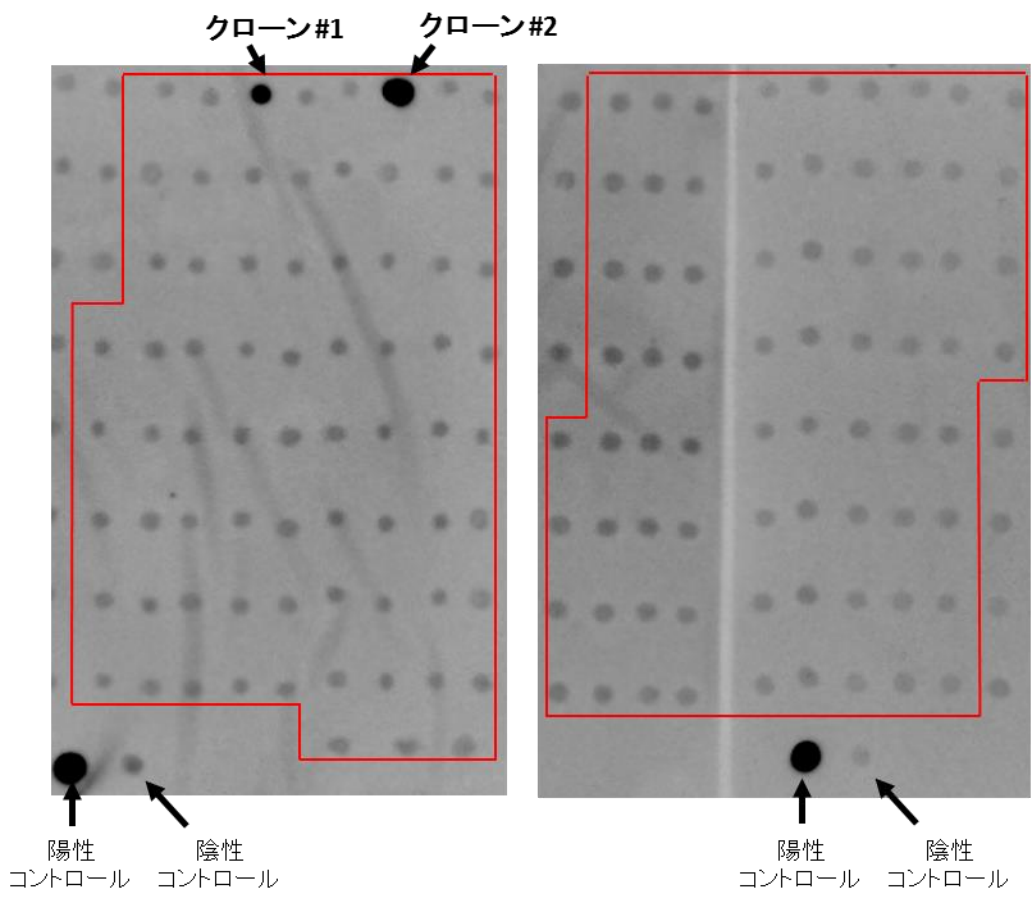
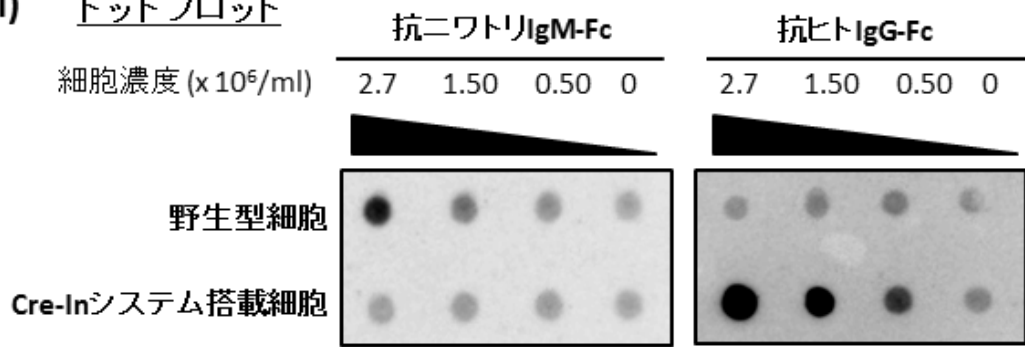


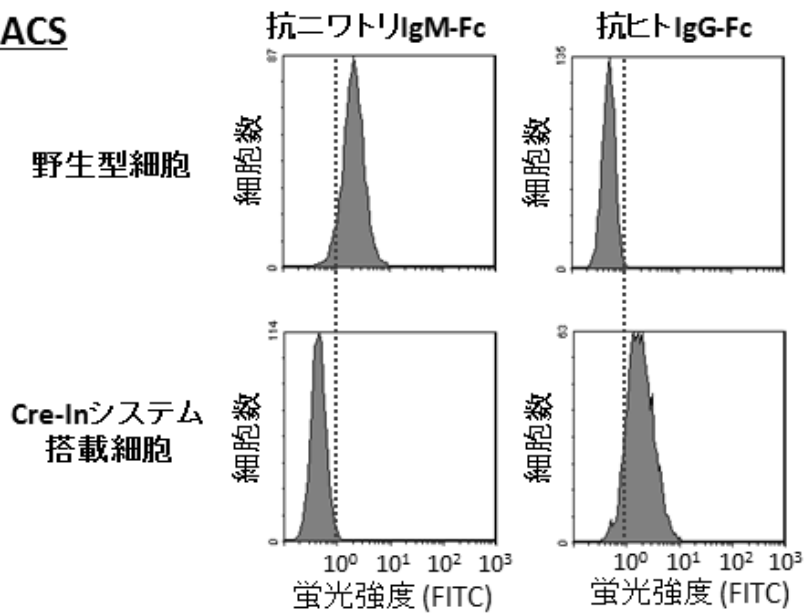
図 3-1B Cre-In システム搭載細胞のスクリーニング

ドットブロット解析によって、ピューロマイシン耐性細胞の中から Cre-In システム搭載細胞を選抜した。培養上清をメンブレンにスポットし、抗ヒト IgG-Fc-HRP 抗体により検出することで、2つの陽性クローンを得た。なお、上記の結果は全 261 株のうち、代表して 220 株のスクリーニング結果を赤枠で囲んでいる。また、矢印で示しているのはコントロール用のスポットであり、陽性コントロールとしては所属研究室で過去に樹立した細胞の培養上清を(Lin *et al*, 2011)、陰性コントロールとしては培養前の培地を用いた。各メンブレンにスポットした陽性コントロールおよび陰性コントロールを矢印で示した。

i) ドットプロット



ii) FACS



iii) RT-PCR

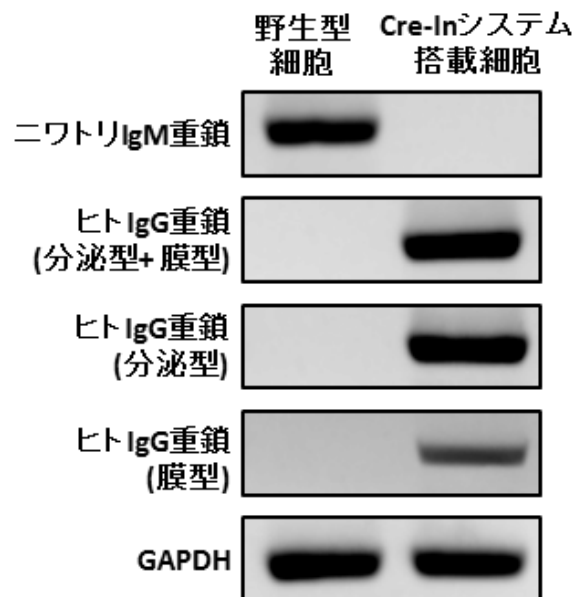


図 3-1C Cre-In システム搭載細胞のヒトキメラ抗体発現状況の解析

p2.2-hIgG1 の導入によりニワトリ IgM 抗体の発現が消失し、新たにヒトキメラ抗体が発現していることをドットプロット、FACS、RT-PCR によって確認した。**i) ドットプロット**：野生型細胞および p2.2-hIgG1 を導入して得た Cre-In システム搭載細胞を段階希釈したのち、48 時間培養した。それぞれの培養液から同量の培養上清を回収し、メンブレンにスポットした。培養上清中に含まれる抗体は、抗ニワトリ IgM-Fc-HRP 抗体もしくは抗ヒト IgG-Fc-HRP 抗体を用いて検出した。それぞれのドット画像の上部に、培養上清を回収した際の最終的な細胞濃度を示した。**ii) FACS**：野生型細胞および Cre-In システム搭載細胞を、抗ニワトリ IgM-Fc-FITC 抗体もしくは抗ヒト IgG-Fc-FITC 抗体を用いて免疫染色したのち、FACS により蛍光強度を計測した。**iii) RT-PCR**：野生型細胞および Cre-In システム搭載細胞から RNA を抽出し逆転写した。それぞれの cDNA に対して、ニワトリ IgM 重鎖、ヒトキメラ IgG 重鎖（分泌型および膜型、分泌型のみ、膜型のみ）、さらにインターナルコントロールとして GAPDH を特異的に増幅するプライマーセットを混合し PCR を行った。なお、各プライマーがアニーリングする位置は、図 3-1A の抗体遺伝子座の模式図中に、黒線で示している。

3-2 Cre-In システムによる Fc 領域の改変

3-1 項で樹立した Cre-In システム搭載細胞株に対し、実際に 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、Fc 領域が改変できることを証明する実験を行った。ここでは、3-1 項で作製した Cre-In システム搭載細胞が発現するヒトキメラ抗体のマウス化を試みた。

図 3-2A に、Cre リコンビナーゼ発現プラスミドおよびドナーベクターの模式図と、本概念検証実験の概略を示した。ドナーベクター pmG2A-4 には、loxP 配列と lox2272 配列の間に、マウス IgG2a-Fc 遺伝子とプロモーターを含まないブラストサイジン耐性遺伝子を挿入している。Cre-In システム動作後に正しく Fc 領域が置換されればゲノム上の CMV プロモーターによりブラストサイジン耐性遺伝子が転写されるようになる。すなわち、薬剤選抜を行うだけで、Fc 領域がマウス IgG 型に変換された細胞が得られるはずである。Cre-In システムによるドナーベクター導入の 24 時間後に、選抜薬剤であるブラストサイジンを添加し、さらにその 4 日後に細胞数が形質転換前と同程度にまで回復することを確認した (図 3-2B)。Cre-In システムによってヒト Fc がマウス Fc に置換されたことを確認するために、3-2 と同様、ドットブロット、FACS、RT-PCR による詳細な解析を行った (図 3-2C)。その結果、膜型と分泌型共に、ヒトキメラ抗体が消失する一方、マウスキメラ抗体が発現していることを確認した。以上から、Cre-In システムが期待通りに機能し、わずか 5 日で Fc 領域が改変できることが証明された。なお、図 3-2C の FACS の結果から、Cre-In システムによる遺伝子置換効率は 98%以上であると推測された。これは、ADLib システムをはじめとする、所望の抗体を発現する細胞株を獲得するための実験を遂行するために十分な置換効率であると考えられる。

以下の項では、Cre-In システムを利用した応用事例について報告する。

Creリコンビナーゼ発現プラスミド
(pCAG-Cre)

ドナーベクター (pmG2A-4)

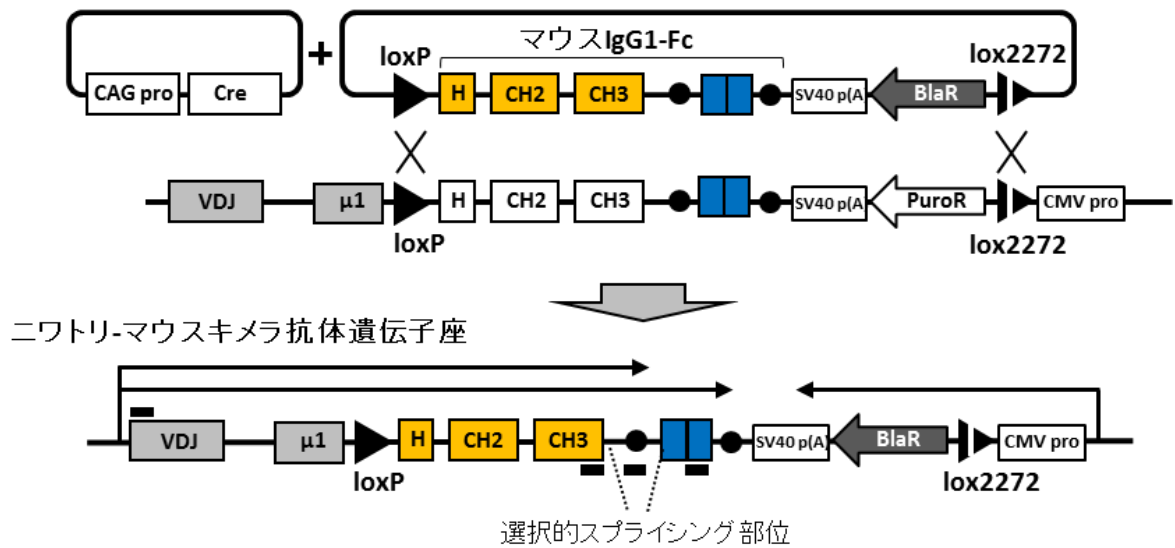


図 3-2A Cre-In システムによる Fc 領域マウス化プロセスの概略

3-1 項で構築したヒトキメラ抗体を発現する Cre-In システム搭載細胞に、マウスキメラ抗体を発現させるために、Cre リコンビナーゼ発現プラスミドとドナーベクターを作製し共導入した。ドナーベクター pmG2A-4 には loxP 配列と lox2272 配列の間に、マウス IgG-Fc およびそれとは逆向きにブラストサイジン耐性遺伝子が挿入されている。さらに、ターゲティングに用いた p2.2-hIgG1 (図 3-1A) と同様、選択的スプライシングを利用して、分泌型マウスキメラ抗体及び膜型マウスキメラ抗体を同時に発現させるため、マウス IgG1-Fc の下流にポリアデニル化シグナルと膜型ドメインの cDNA を配置した。なお、抗体遺伝子座の上下に示されている黒線は、図 3-2C の RT-PCR 解析で使用したプライマーのアニーリング箇所を示している。

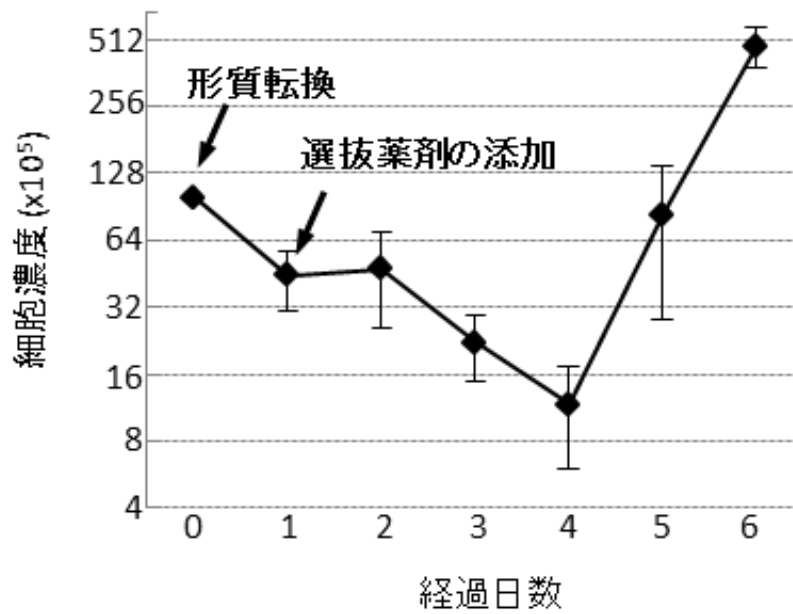
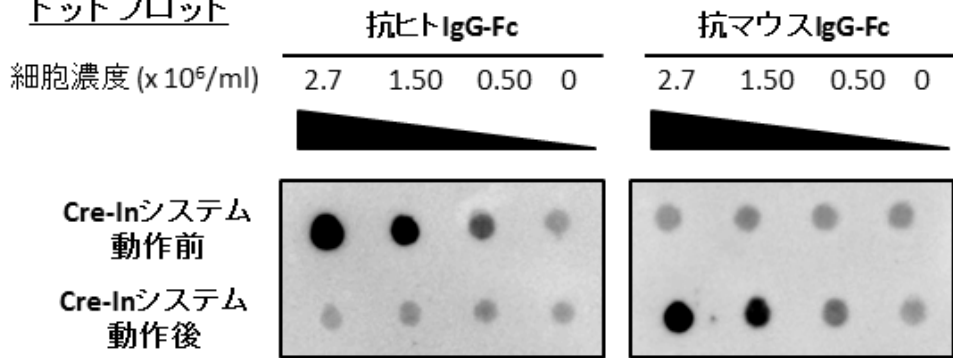
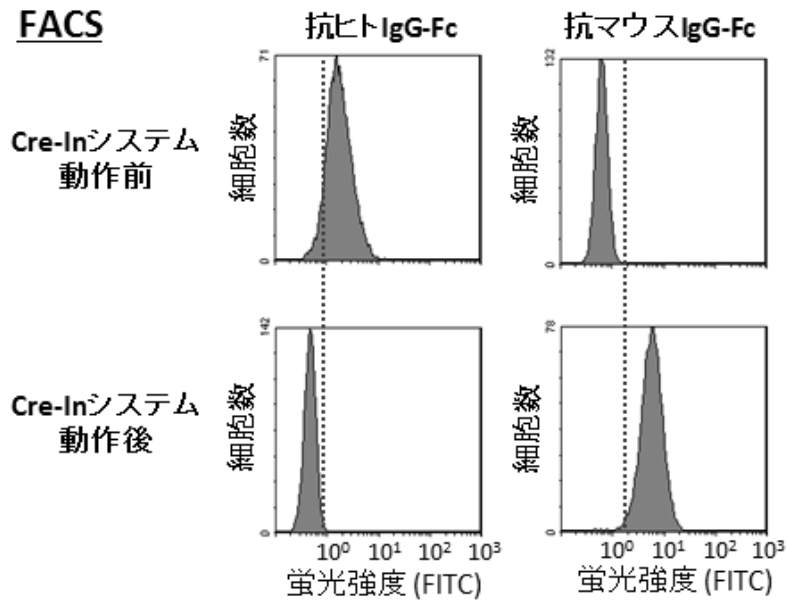


図 3-2B ドナーベクターと Cre リコンビナーゼ発現プラスミドの共導入後の生細胞数経時変化
トランスフェクションを実施した日を 0 日目として、生細胞数を計数した結果を示した。

ドットプロット



FACS



RT-PCR

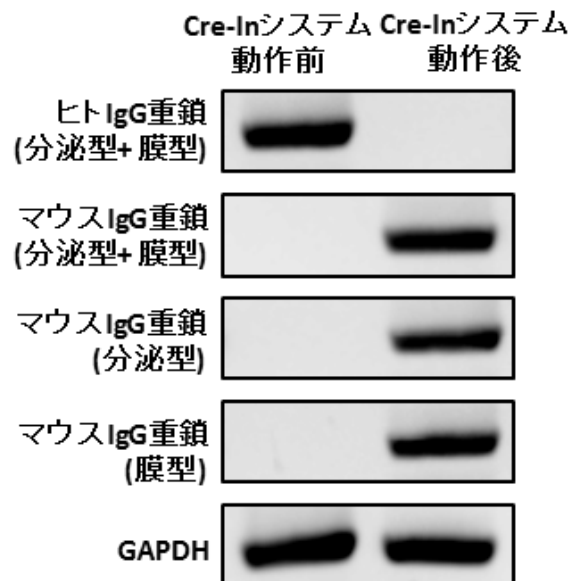


図 3-2C Cre-In システムによるマウス IgG2a 化後のマウスキメラ抗体発現状況

ドットブロット、FACS、RT-PCR によって、ヒトキメラ抗体の発現が消失し、新たにマウスキメラ抗体が発現していることを確認した。i) **ドットブロット** : Cre-In システム前後の細胞をそれぞれ段階希釈したのち、48 時間培養した。それぞれの培養液から同量の培養上清を回収し、メンブレンにスポットした。培養上清中に含まれる抗体は、抗ヒト IgG-Fc-HRP 抗体もしくは抗マウス IgG-Fc-HRP 抗体を用いて検出した。それぞれのドット画像の上部に、培養上清を回収した際の最終的な細胞濃度を示した。ii) **FACS** : Cre-In システム前後の細胞を、抗ヒト IgG-Fc-FITC 抗体もしくは抗マウス IgG-Fc-FITC 抗体を用いて免疫染色したのち、FACS により蛍光強度を計測した。iii) **RT-PCR** : Cre-In システム前後の細胞からそれぞれ RNA を抽出し逆転写した。それぞれの cDNA に対して、ヒトキメラ IgG 重鎖、マウスキメラ IgG 重鎖 (分泌型および膜型、分泌型のみ、膜型のみ)、さらにインターナルコントロールとして GAPDH を特異的に増幅するプライマーセットを混合し PCR を行った。なお、各プライマーがアニーリングする位置は、図 3-2A の抗体遺伝子座の模式図中に、黒線で示している。

3-3 BGH ターミネーター挿入による膜型キメラ抗体発現量の増強

ADLib システムでは、DT40 細胞膜上に発現する抗体と、磁気ビーズを固定した抗原との物理的相互作用を利用して、モノクローナル抗体を選抜する (図 1-4)。つまり、効率的にモノクローナル抗体をセレクションする上で、DT40 細胞上に十分量の膜型抗体が発現していることが重要である。図 3-1C で示した FACS 解析の結果から、現状における膜型ヒトキメラ抗体の発現量が、野生型の DT40 細胞が発現する膜型 IgM 抗体の量に比べて著しく低いことが懸念された。このままでは ADLib システムによるキメラ抗体のセレクション効率が下がる可能性があったため、膜型キメラ抗体発現量の改善を目指した。

抗体発現量を増強するために、野生型のターミネーター配列を、mRNA を安定化し発現量を改善するとされる BGH (Bovine Growth Hormone)ターミネーターに置換することにした(Kakoki *et al*, 2004; Goodwin & Rottman, 1992)。図 3-3A に示したように、Cre-In システムを利用することで、Fc 置換同様、ターミネーター置換も迅速かつ容易に行うことができる。ドナーベクター phIgG-3 には、ヒト IgG1-Fc 遺伝子の膜ドメインの下流に前述した BGH ターミネーターを挿入し、さらにプロモーターを含まないブラストサイジン耐性遺伝子を配置した。このドナーベクターを 3-1 項で作製した Cre-In システム搭載細胞に、Cre リコンビナーゼ発現プラスミドと共に導入した。ブラストサイジンによる薬剤選抜後、膜型ヒトキメラ抗体の発現量を FACS と定量 RT-PCR で解析した (図 3-3B)。FACS 解析の結果、Cre-In システム前の DT40 細胞と比較して、膜型抗体の量が著しく増加していることが確認できた。定量 RT-PCR の結果によると、BGH ターミネーターの効果によって、転写量が約 40 倍に増加していることがわかった。

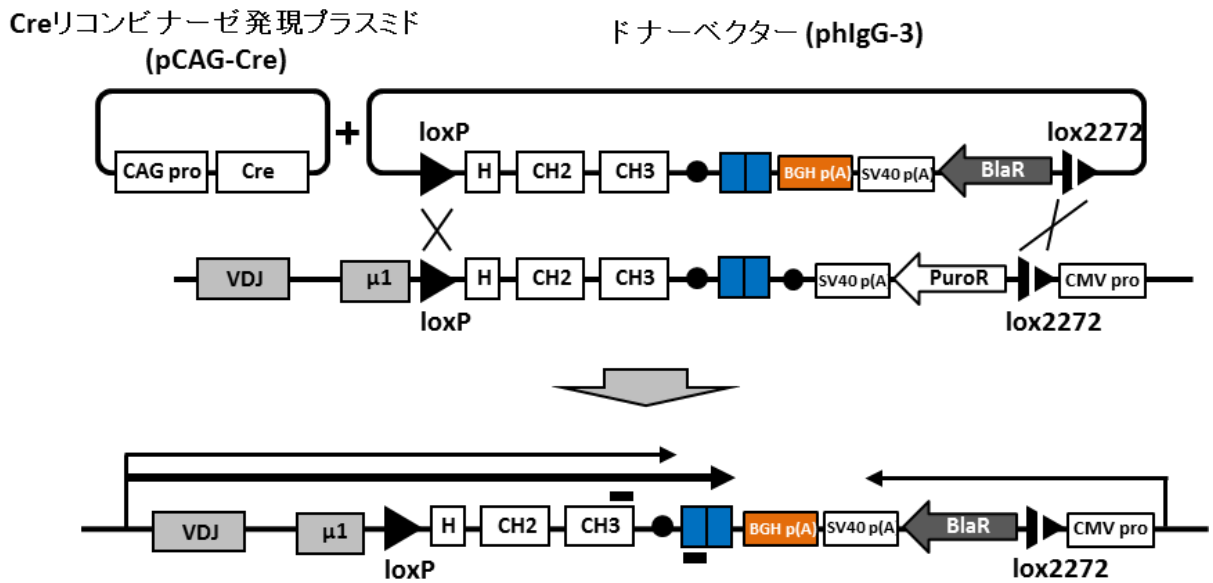


図 3-3A 膜型ヒトキメラ抗体の発現量増強

3-1 項で構築した Cre-In システム搭載細胞の膜型ヒトキメラ抗体の発現量を増強するためのドナーベクターを作製し、Cre リコンビナーゼ発現プラスミドと共に導入した。ドナーベクター-phIgG-3 では、野生型ポリアダニル化シグナルの代わりに BGH ターミネーターを挿入し、またヒト IgG-Fc とは逆向きにブラストサイジン耐性遺伝子を配置している。なお、抗体遺伝子座の上下に示されている黒線は、図 3-3B の定量 RT-PCR 解析で使用したプライマーのアニーリング箇所を示している。

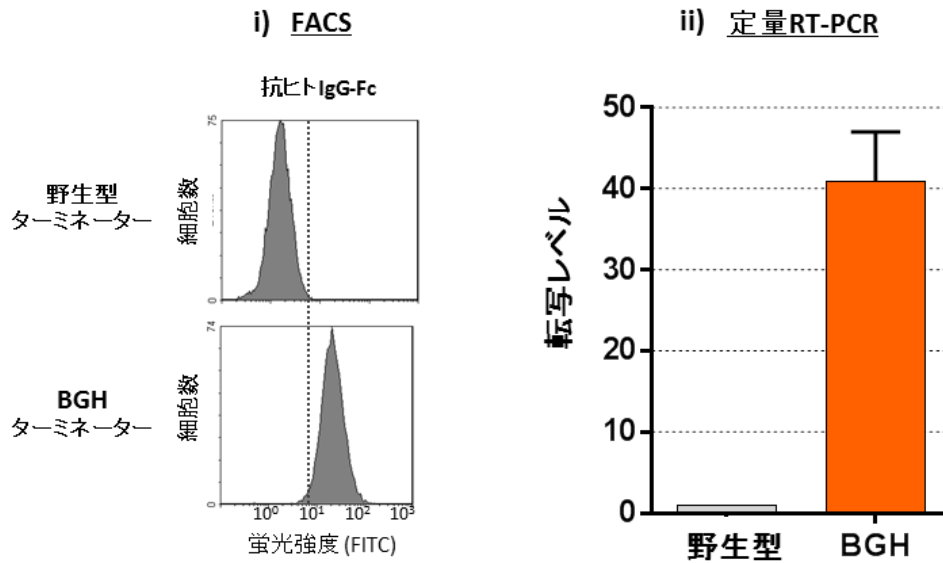


図 3-3B BGH ターミネーター導入後の膜型ヒトキメラ抗体発現の確認

FACS と定量 RT-PCR によって、膜型ヒトキメラ抗体の発現量が改善していることを確認した。

i) FACS : Cre-In システム前後の細胞を、抗ヒト IgG-Fc-FITC 抗体で免疫染色したのち、FACS により蛍光強度を計測した。**ii) 定量 RT-PCR** : Cre-In システム前後の細胞からそれぞれ RNA を抽出し逆転写した。それぞれの cDNA に対して、膜型ヒトキメラ IgG 重鎖を特異的に増幅するプライマーセットを混合し、定量 PCR を行った。転写レベルは GAPDH の転写量でノーマライズした。なお、プライマーがアニーリングする位置は、図 3-3A の抗体遺伝子座の模式図中に、黒線で示している。

3-4 Cre-In システム搭載細胞を用いた ADLib システムのヒトキメラ型抗体スクリーニングと、その Fc 領域のマウス抗体への迅速改変

3-3 項で膜型ヒトキメラ抗体発現量の増強に成功した Cre-In システム搭載細胞を用いて、抗原特異的に結合するモノクローナル抗体を発現する DT40 細胞を獲得するために、本細胞を用いてライブラリを構築し ADLib システムを実施した。まず始めに、BGH ターミネーターで発現量を増強済みの Cre-In システム搭載細胞を 2.5 ng/mL の TSA 処理下で 4 週間培養することにより、DT40 細胞ベースの抗体ライブラリを構築した。その後、第 2 章 2-9 項に記した磁気ビーズを利用したセレクション方法を用いて、抗原と結合する抗体産生クローンの単離を試みた。なお、抗原としては EGFR とリゾチームを用いた。得られた候補クローンの培養上清を用いた ELISA スクリーニングの結果、それぞれにおいて抗原結合性を持つ抗体を発現するクローンを複数獲得することができた (図 3-4A)。それらの候補クローンについて、複数の陰性クローンを用いた ELISA による詳細な特異性検定を行った結果、抗原に対して特異的に結合する抗体を獲得できていることを確認した (図 3-4B)。

次に、ADLib システムによって得られた抗原特異的 DT40 細胞クローンの抗体 Fc 領域が 3-3 項と同様に Cre-In システムによって改変が可能であるかどうかを確かめるために、抗 EGFR 抗体および抗リゾチーム抗体をマウス化する実験を行った。図 3-4C に示したように、ドナーベクター pmG3-4BP および pmG2a-4BP はそれぞれマウス IgG3-Fc 遺伝子およびマウス IgG2a-Fc 遺伝子を含んでおり、さらにプロモーターを含まないピューロマイシン耐性遺伝子を配置した。これらを上記で得られた抗 EGFR 及び抗リゾチームのヒトキメラ型抗体発現細胞に、Cre リコンビナーゼ発現プラスミドと共に導入した。ピューロマイシンによる薬剤選抜後、Cre-In システムによってヒトキメラ抗体がマウスキメラ抗体に置換されたことを FACS により確認した (図 3-4D)。また培養上清を利用した ELISA による特異性検定の結果、マウス IgG3 型キメラ抗体およびマウス IgG2a 型キメラ抗体が、Cre-In システム実施前のヒト IgG1 型キメラ抗体と同等の抗原

特異性を保持していることを確認した (図 3-4E)。

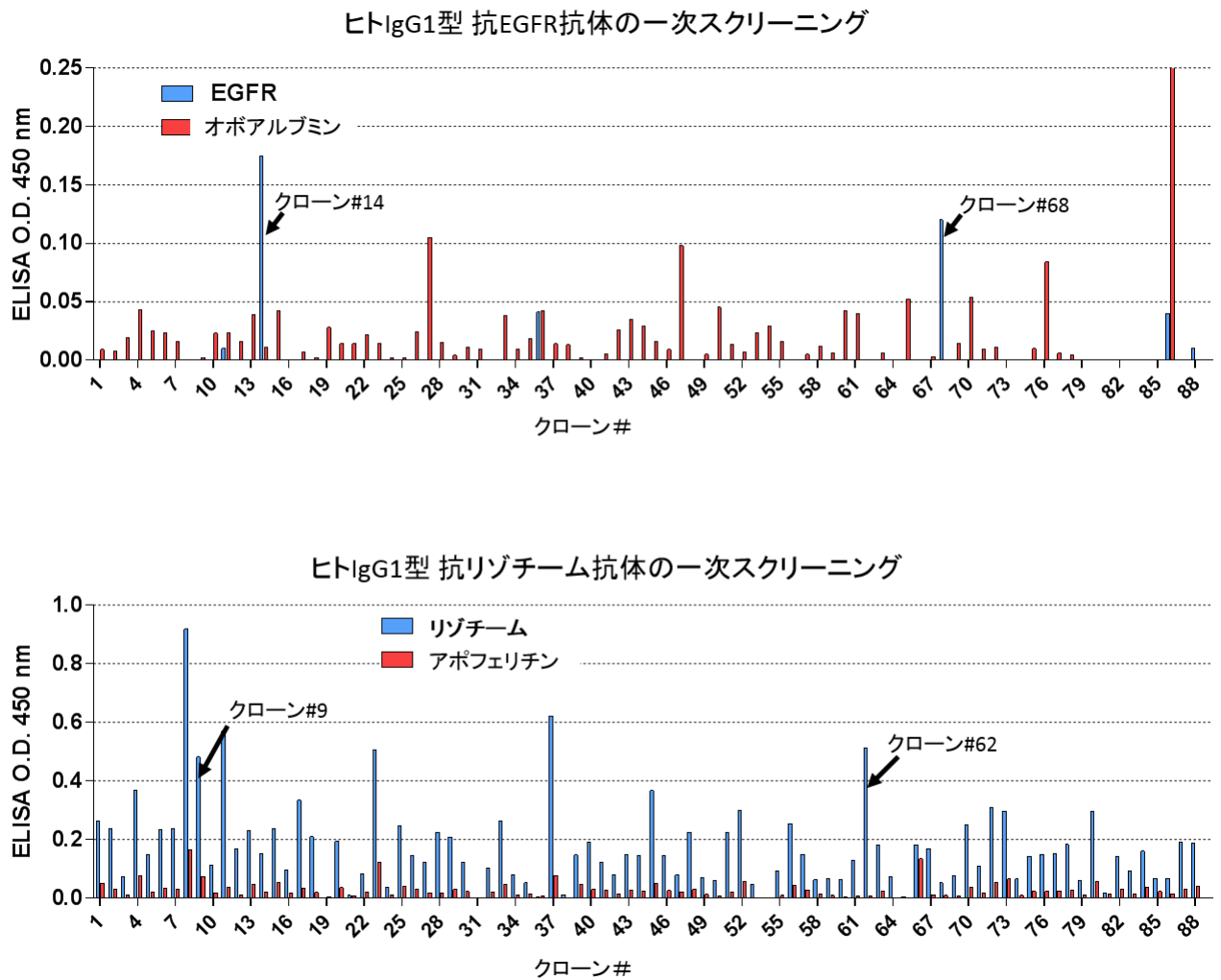


図 3-4A ADLib システムによる抗原特異的ヒト IgG1 キメラ型モノクローナル抗体の取得

3-3 項で作製したヒトキメラ抗体を発現する Cre-In システム搭載細胞に対して TSA 処理を行うことで、抗体ライブラリを作製した。このライブラリに対して EGFR (上段) もしくはリゾチーム (下段) を固定した磁気ビーズを混合することで、スクリーニングを行った。選抜したクローンの抗原結合性を解析するために、培養上清を回収して ELISA に用いた。陰性コントロールには、オボアルブミンとアポフェリチンをそれぞれ用いた。

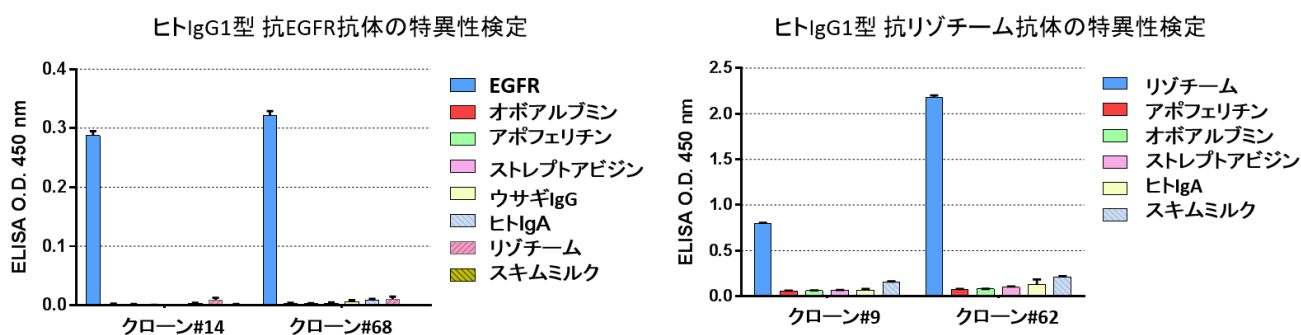


図 3-4B ヒト IgG1 キメラ抗体の特異性検定

図 3-4A でスクリーニングした DT40 細胞クローンが発現するヒトキメラ抗体の特異性検定を行った。抗 EGFR 抗体 (左) および抗リゾチーム抗体 (右) それぞれのクローンから培養上清を回収し、ELISA に用いた。抗 EGFR 抗体の陰性コントロールには、オボアルブミン、アポフェリチン、ストレプトアビジン、ウサギ IgG、ヒト IgA、リゾチーム、スキムミルクを用いた。また、抗リゾチーム抗体の陰性コントロールには、アポフェリチン、オボアルブミン、ストレプトアビジン、ヒト IgA、スキムミルクを用いた。



図 3-4C ヒトキメラ型モノクローナル抗体のマウス化に用いたドナーベクターの概略

マウス IgG3 化およびマウス IgG2a 化するために、pmIgG3-4BP および pmIgG2a-4BP を作製した。

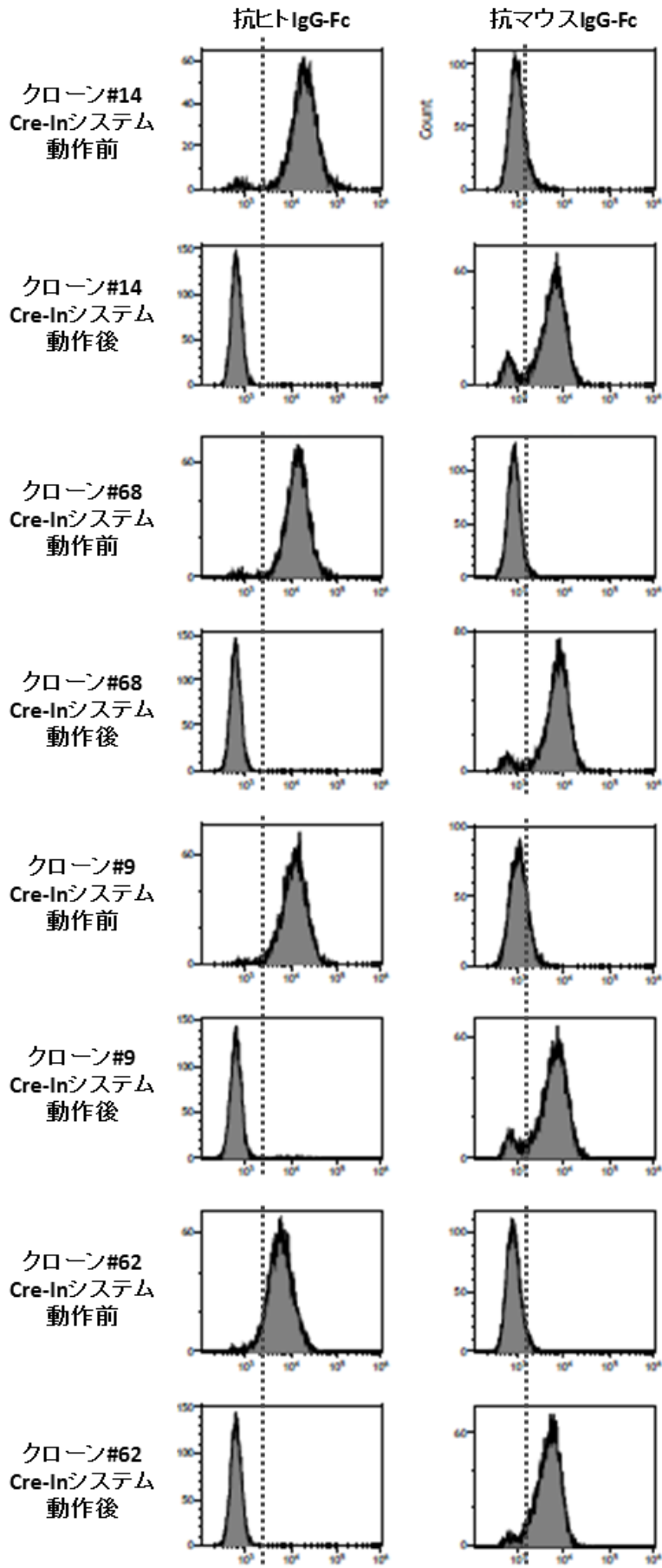


図 3-4D Cre-In システムによるヒトキメラ抗体のマウス化

図 3-4B で樹立した 4 株のヒト IgG1 キメラ抗体発現細胞に対して、それぞれ Cre-In システムを実施した。Cre-In システム前後の細胞を、抗ヒト IgG-Fc-FITC 抗体もしくは抗マウス IgG-Fc-FITC 抗体を用いて免疫染色したのち、FACSにより蛍光強度を計測した。ここではドナーベクター-pmIgG3-4BP を導入して、マウス IgG3 型キメラ抗体を作製した結果を示している。

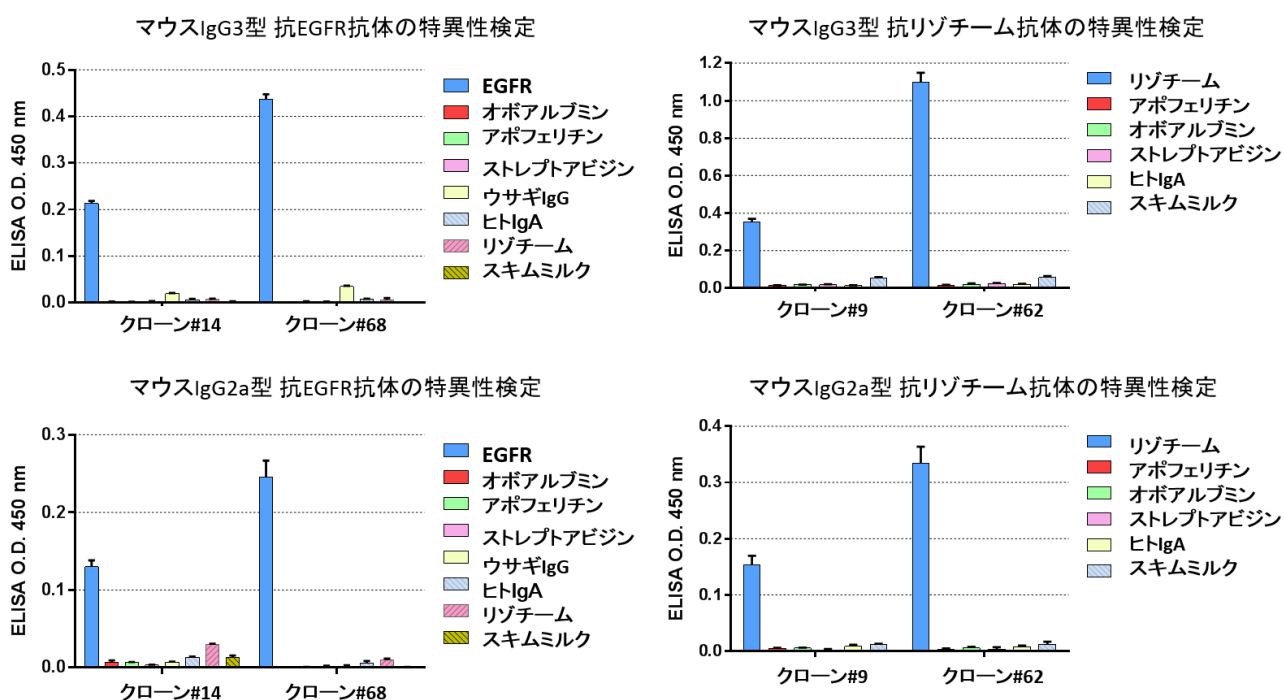


図 3-4E マウスキメラ抗体の特異性検定

ADLib システムで選抜したモノクローナル抗体を、Cre-In システムでマウス化した抗体の特異性検定を行った。マウス IgG3 型抗 EGFR 抗体 (左上)、IgG2a 型抗 EGFR 抗体 (左下)、マウス IgG3 型リゾチーム抗体 (右上)、マウス IgG2a 型リゾチーム抗体 (右下) をそれぞれ発現している細胞から培養上清を回収し ELISA に用いた。陰性コントロールには、図 3-4B で用いたものと同じ抗原を用いた。

3-5 ADLib スクリーニングに先行した Fc 領域の改変

3-4 項では、最初に ADLib システムによってヒトキメラ型のモノクローナル抗体を作製し、その後に Cre-In システムによって Fc 領域を改変することで、マウスキメラ型の抗体を作製できることを示した。一方で、Cre-In システム搭載細胞を用いれば、最初に Cre-In システムによって Fc 領域を改変し、その改変型抗体フォーマットで ADLib システムを実施することも可能であると考えられる。

この可能性を検証するために、TSA 処理に先んじて Cre-In システムを実施することにより、マウスキメラ抗体発現細胞を得ることとした。まず図 3-5A に示したドナーベクター pmG2A-4B を 3-1 項で樹立した、ヒト IgG キメラ抗体を発現する Cre-In システム搭載細胞に導入した（本細胞は最初に作製したピューロマイシン耐性の Cre-In システム搭載細胞であるため、ドナーベクターは 3-4 項で用いた pmG2A-4BP ではなく、ブラストサイジン耐性遺伝子を持つ pmG2A-4B を新たに準備した）。ブラストサイジンによる薬剤選抜後、2.5 ng/mL の TSA 存在下で 3 週間培養することにより、マウス IgG2a 型の抗体ライブラリを構築した。TSA 処理後、第 2 章 2-9 項に記した磁気ビーズを利用したセレクション方法を用いて、EGFR と結合する抗体を発現する DT40 細胞の選別を行った。ELISA の結果、EGFR 結合性を持つ抗体を発現するクローンを複数獲得することができた（図 3-5B）。それらの候補クローンについて、さらに ELISA による詳細な特異性検定を行った結果、抗原に対して特異的に結合する抗体を獲得できていることが確認できた（図 3-5C）。以上から、ADLib システムによる抗原特異的クローン樹立の前後に関わらず、Cre-In システムによる Fc 領域の改変が可能であることが示された。

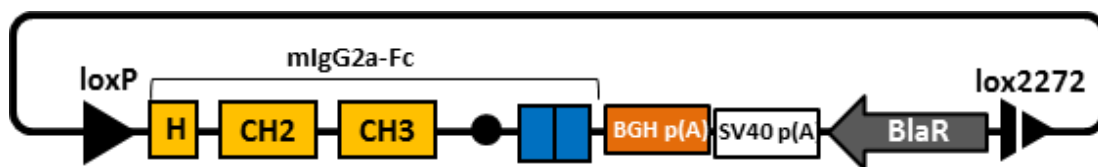


図 3-5A マウス IgG2a 型抗体ライブラリを作製するためのドナーベクター

マウス IgG2a 化するために pmIgG2a-4B を作製した。基本構造は図 3-5C で記載した pmIgG2a-4BP と同じだが、ピューロマイシン耐性遺伝子ではなく、ブラスサイジン耐性遺伝子を挿入している。

マウスIgG2a型 抗EGFR抗体の一次スクリーニング

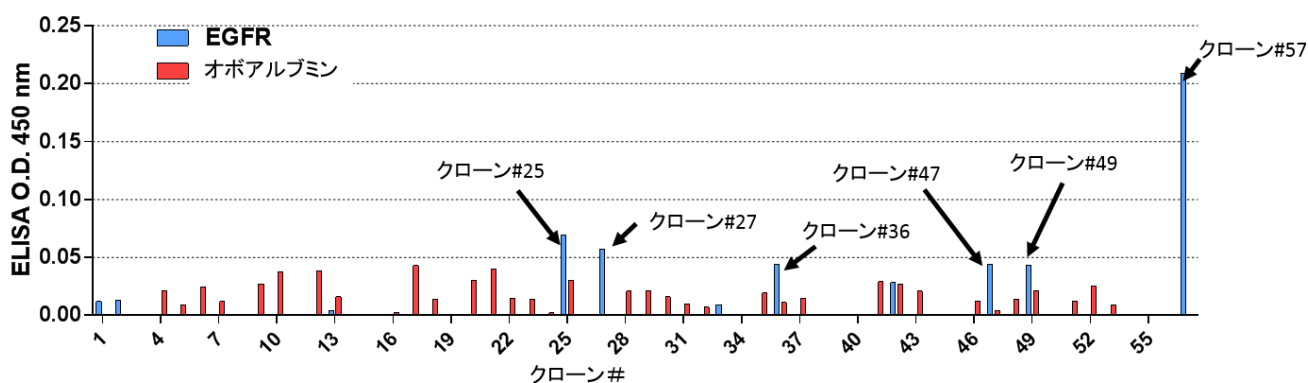


図 3-5B ADLib システムによる抗原特異的マウス IgG2a キメラ型モノクローナル抗体の取得

マウスキメラ抗体を発現する Cre-In システム搭載細胞に対して TSA 処理を行うことで、抗体ライブラリを作製した。このライブラリに対して EGFR を固定した磁気ビーズを混合することで、スクリーニングを行った。選抜したクローンの抗原結合性を解析するために、培養上清を回収して ELISA に用いた。陰性コントロールには、オボアルブミンを用いた。

マウスIgG2a型 抗EGFR抗体の特異性検定

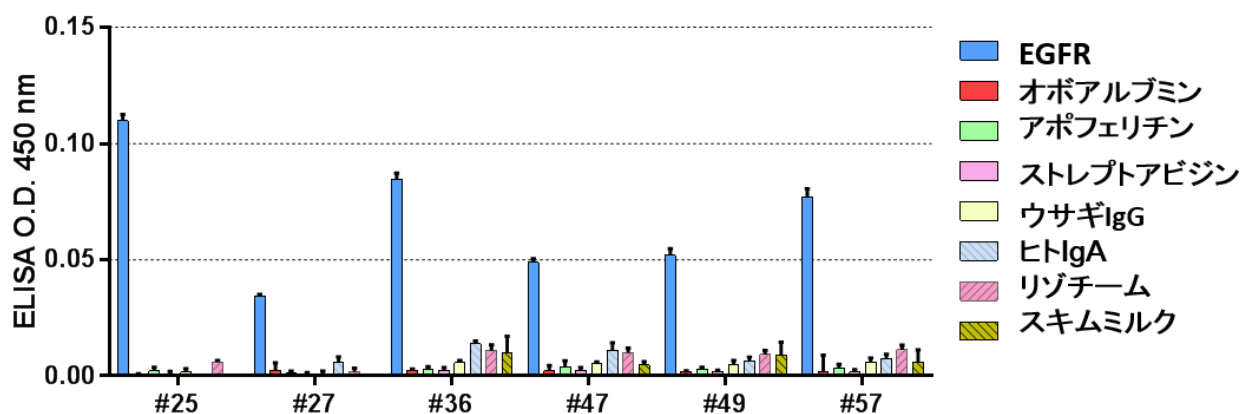


図 3-5C マウス IgG2a キメラ抗体の特異性検定

ADLib システムで選抜したモノクローナル抗体の特異性検定を行った。それぞれの細胞から培養上清を回収し ELISA に用いた。陰性コントロールには、図 3-5B で用いたものと同じ抗原を用いた。

3-6 キメラ抗体の生化学的特徴解析

得られたキメラ抗体の生化学的特徴を解析するため、3-4 項で作製した抗 EGFR 抗体発現細胞を大量培養し、培養上清から抗体を精製した。本研究で得られたすべてのキメラ抗体は IgG 型のキメラ抗体であるため、第 2 章 2-10 項に記した ProteinG を用いたアフィニティ精製により、簡便に精製することができた。

次に精製抗体を用いた ELISA による特異性検定を行った。その結果、精製前の抗原特異性を維持していることが確認できた (図 3-6A)。さらに抗 EGFR 抗体について、ヒト IgG キメラをマウス IgG キメラに変換した際の抗原抗体反応への影響を詳細に解析するため、表面プラズモン共鳴測定を試みた (図 3-6B)。EGFR を固定化したセンサーチップ上に段階希釈した精製抗体をアプライしたところ、抗体濃度に依存したセンサグラムを検出できた。フィッティング解析により KD 値を算出したところ、ヒトキメラ抗体の EGFR に対する親和性は、Cre-In システムによりマウスキメラ抗体に変換した後もオーダーに差が無いことが明らかになった。このことから、Cre-In システムの前後で、抗体が抗原に対して同程度の親和性を維持していることが確かめられた。

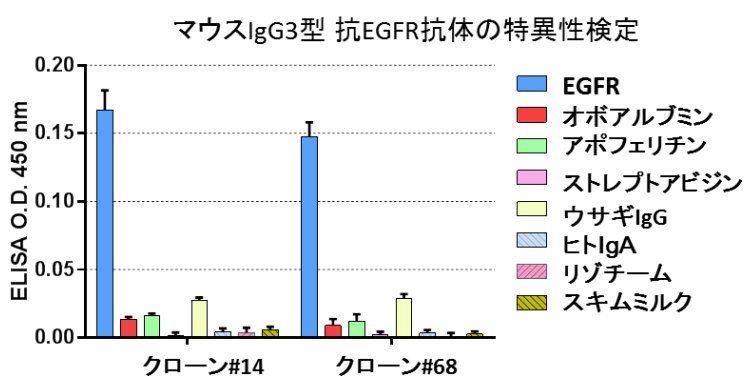
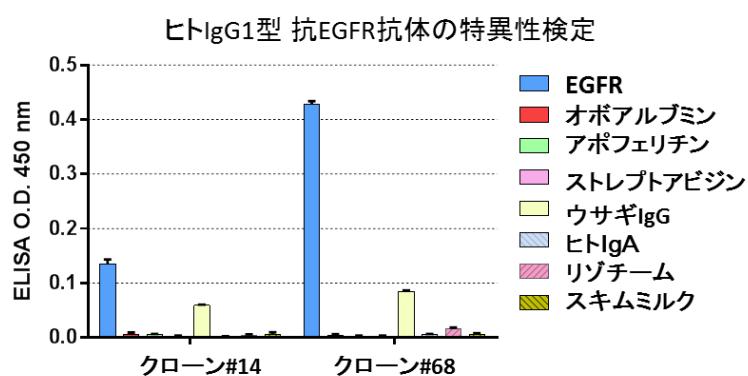


図 3-6A 精製したヒト IgG1 キメラ抗体およびマウス IgG3 キメラ抗体の特異性検定

EGFR 特異的なヒト IgG1 キメラ (上段) およびマウス IgG3 キメラ (下段) モノクローナル抗体を精製し、特異性検定を行った。陰性コントロールとして、図 3-4B で用いたものと同じ抗原を用いた。

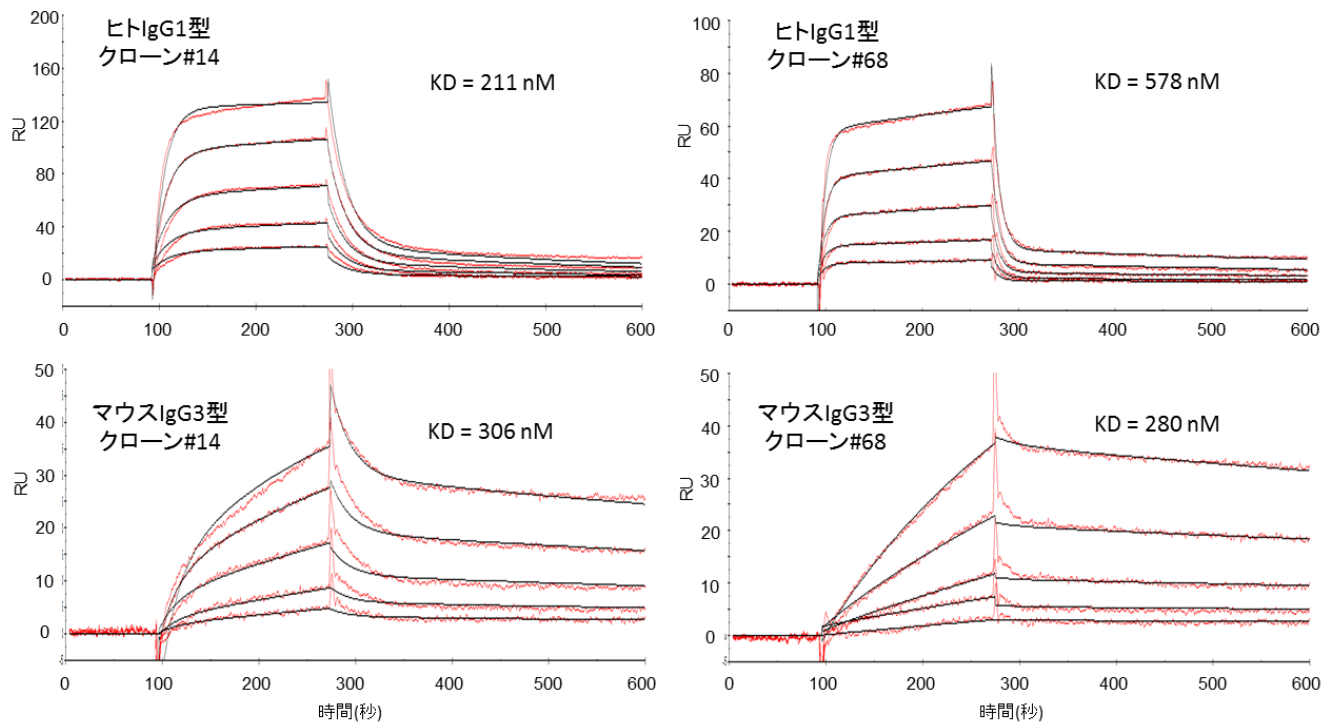


図 3-6B 表面プラズモン共鳴測定によるキメラ抗体のキネティクス解析

EGFR を固定化したセンサーチップに対して、段階希釈した精製キメラ抗体を送液した。KD 値は bivalent analyte model でフィッティングすることにより算出した。

3-7 蛍光タンパク質融合抗体の作製

Cre-In システムを応用することで、既存の抗体に機能性を付加することが可能となる。例えば、蛍光分子を融合した抗体は、FACS 解析や蛍光顕微鏡観察、生体イメージング等を行う上で有用である。本項では、3-4 項で樹立した抗 EGFR 抗体産生細胞に対して、Cre-In システムによってドナーベクター pAbCitP を導入することで、蛍光タンパク質融合抗体を作製した (図 3-7A)。今回用いた蛍光タンパク質 Citrine は、分泌の経過を経ても立体構造を保ちやすいことが知られている (Haas *et al*, 2010)。ピューロマイシンによる薬剤選抜後の細胞の培養上清および精製抗体を用いて、ELISA による特異性検定を行った (図 3-7B)。その結果、Citrine 融合抗体が EGFR に対する特異性を維持していることが確かめられた。

次に、蛍光標識抗体としての Citrine 融合抗体の有用性を確かめる実験を行った。細胞膜上に EGFR を発現している CHO-S 細胞を準備し、Citrine 融合抗体を含む培養上清と共にインキュベーションしたのち、FACS 解析および蛍光顕微鏡観察を行った (図 3-7C)。FACS 解析の結果、EGFR を膜上に発現していない野生型の CHO-S 細胞と比較して、EGFR 発現 CHO-S 細胞では明確な蛍光ピークのシフトが検出された。さらに蛍光顕微鏡でも、CHO-S 細胞膜上に蛍光の集積が観察された。以上から、Cre-In システムによって作製された蛍光タンパク質融合抗体の有用性が示された。

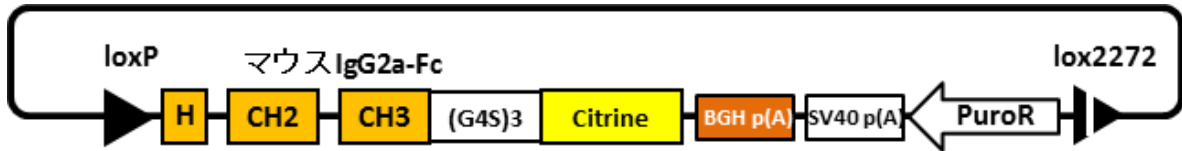


図 3-7A 蛍光タンパク質融合抗体を作製するためのドナーベクター

蛍光タンパク質 Citrine の遺伝子を含むベクター pAbCitP を作製した。マウス IgG2a-Fc の下流に GGGGS を 3 回繰り返したリンカー配列を介して Citrine 遺伝子を融合した。

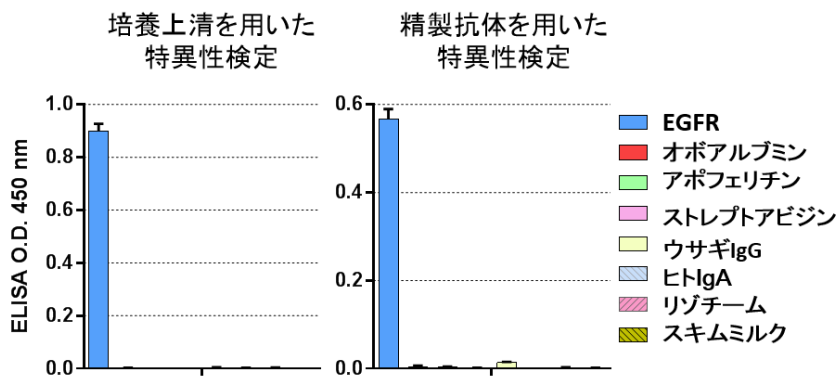
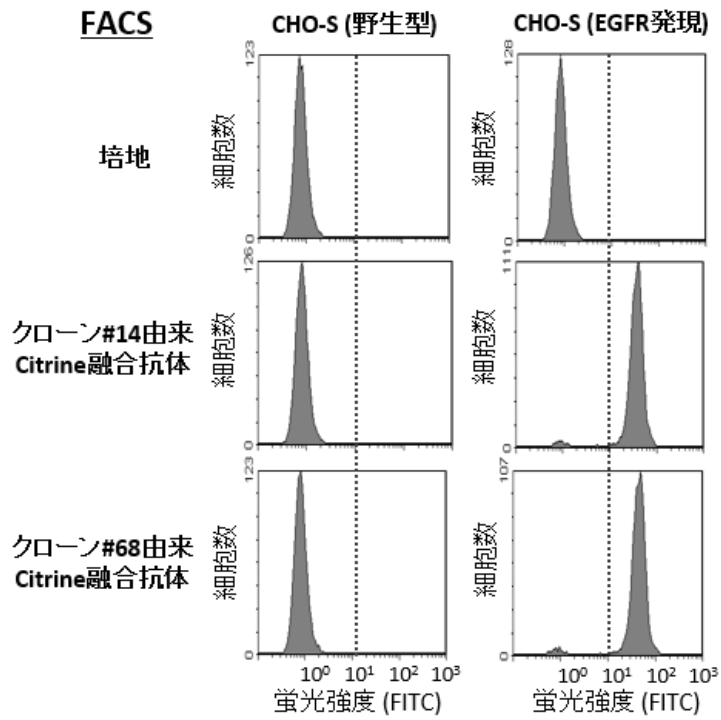


図 3-7B 蛍光タンパク質融合抗体の特異性検定

培養上清中 (左) および精製後 (右) の Citrine 融合抗体の特異性検定を行った。陰性コントロールとして、図 3-4B で用いたものと同じ抗原を用いた。



蛍光顕微鏡

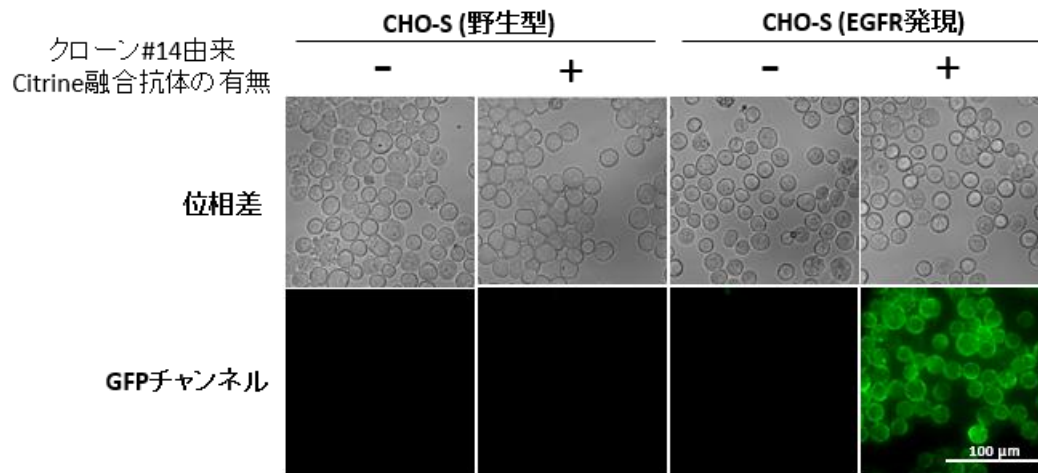


図 3-7C 蛍光タンパク質融合抗体の応用事例

EGFR を膜上に強制発現する CHO-S 細胞を、Citrine 融合抗体と含む培養上清と混合し、FACS (上段) および顕微鏡観察 (下段) を行った。コントロールとして、EGFR を強制発現しない野生型 CHO-S 細胞を用いた。

3-8 Fc 受容体親和性強化抗体 の 作製

より治療効果の高い抗体医薬を作製するための戦略の1つとして、ADCC 活性などの抗原抗体反応後の免疫反応を強化することが挙げられる。ADCC 活性が、NK 細胞などの細胞傷害性の免疫細胞が抗体の Fc 領域を認識することによって惹起されることから、抗体医薬開発において Fc エンジニアリングは重要である。本項では、Cre-In システムを利用した Fc エンジニアリングの可能性を検証した。

先行研究において、Fc γ R111a に対する親和性が強化できるとされる Fc 変異が複数報告され、この親和性が高いほど ADCC 活性が高いことが分かっている(Shields *et al*, 2001; Lazar *et al*, 2006; Richards *et al*, 2008; Smith *et al*, 2012)。これらの変異を 3-4 項で樹立した抗 EGFR 抗体産生細胞に導入するため、5 つのドナーベクターを用意した (図 3-8A、ネガティブコントロールとして Fc 親和性を失う変異を持つもの (アスパラギン残基変異体) も含む)。これらのドナーベクターを Cre-In システムによってそれぞれ導入することで、Fc 変異を含むヒトキメラ抗体を作製した。培養上清を用いた特異性検定の結果、これらの抗体は EGFR に対する結合特異性を維持していた (図 3-8B)。

Fc 変異を含むヒトキメラ抗体の Fc γ R111a に対する親和性を解析するために、FACS 解析と表面プラズモン共鳴測定を行った。FACS 解析ではまず始めに、細胞膜上に Fc γ R111a を発現している HEK293 細胞を構築し、精製したヒトキメラ抗体と共にインキュベートした。その後、Fc γ R111a と結合しているヒトキメラ抗体を二次抗体で検出し、FACS により解析した。その結果、各変異体の相対的なシグナル強度は先行研究で報告されている親和性を反映していた (図 3-8C)。

さらに、Fc 変異を含むヒトキメラ抗体と Fc γ R111a との相互作用を表面プラズモン共鳴により測定した (図 3-8D)。フィッティング解析により KD 値を算出したところ、先行研究で報告されている親和性改善が再現できた。以上から、Cre-In システムを応用することで、生体が有する免疫反応を強化可能な Fc エンジニアリングが可能であることが示された。

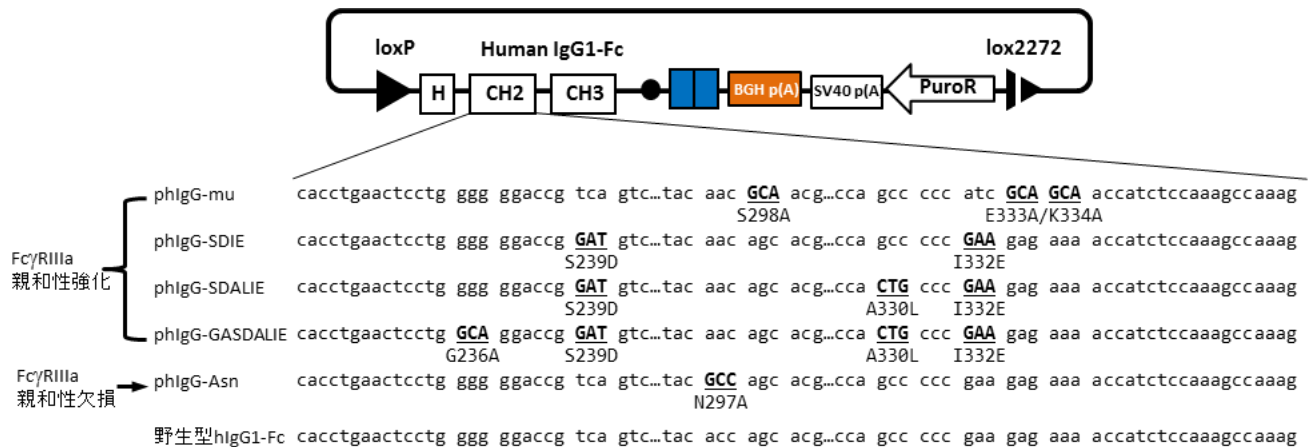


図 3-8A Fc に変異導入したヒトキメラ抗体を作製するためのドナーベクター

FcγRIIIa への親和性が強化される 4 種類の Fc 領域（それぞれ phIgG-mu, phIgG-SDIE, phIgG-SDALIE, phIgG-GASDALIE に対応）を導入したドナーベクターを作製した。なお、FcγRIIIa への親和性が失われる N297A 変異を導入したドナーベクターも併せて作製した。ドナーベクター名の右側に、DNA 配列および Kabat number (Wu & Kabat, 1970) でナンバリングしたアミノ酸置換を示した。

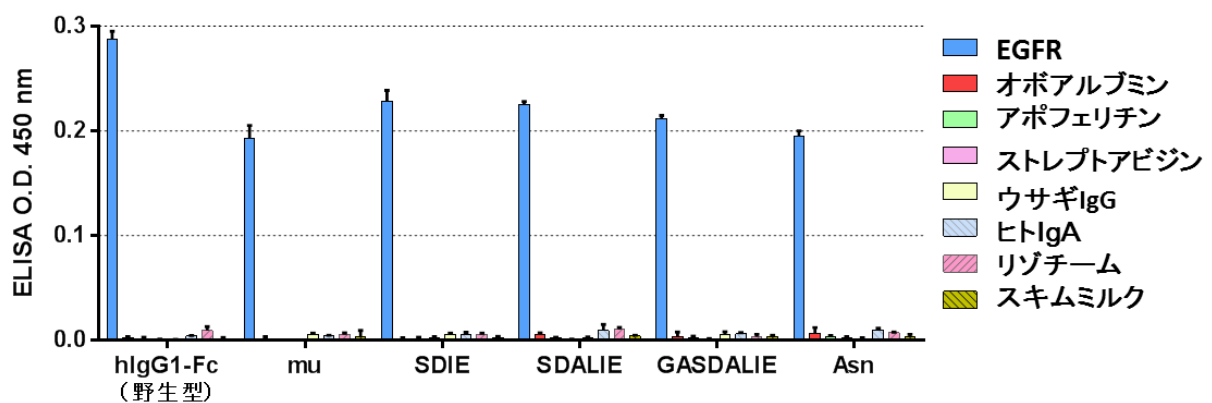


図 3-8B Fc に変異導入したヒトキメラ抗体の特異性検定

Cre-In システムで Fc 領域に図 3-8A に記載した変異を導入したヒトキメラ抗体の特異性検定を行った。それぞれの細胞から培養上清を回収し ELISA に用いた。陰性コントロールには、図 3-5B で用いたものと同じ抗原を用いた。

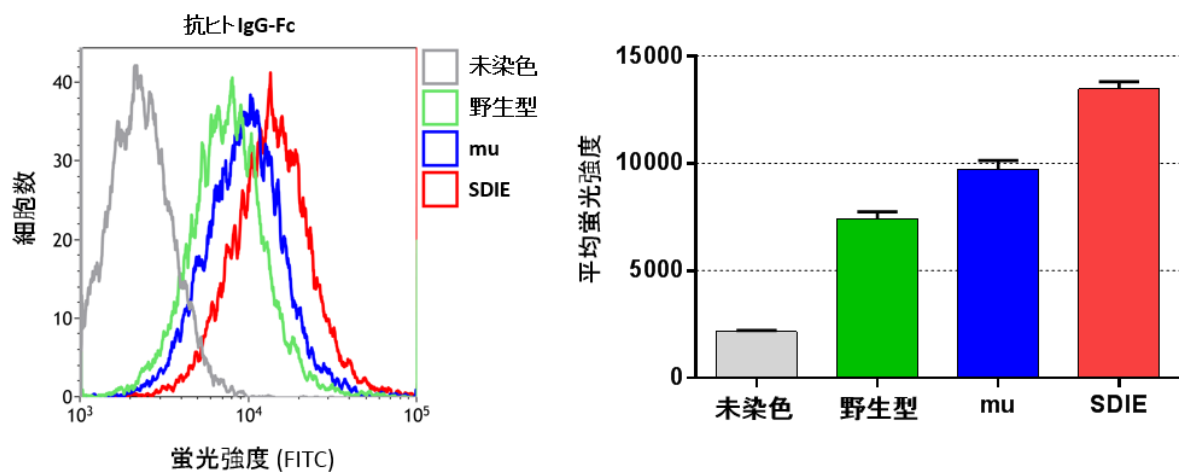


図 3-8C FACS を用いた Fc γ RIIIa に対する Fc に変異導入したヒトキメラ抗体の親和性解析

Fc γ RIIIa を強制発現させた HEK293 細胞を、精製したヒトキメラ抗体と反応させた後、FITC 標識した抗ヒト IgG 二次抗体で染色し、FACS により解析した。なお、FACS で計測した平均蛍光強度を右の棒グラフに示している。

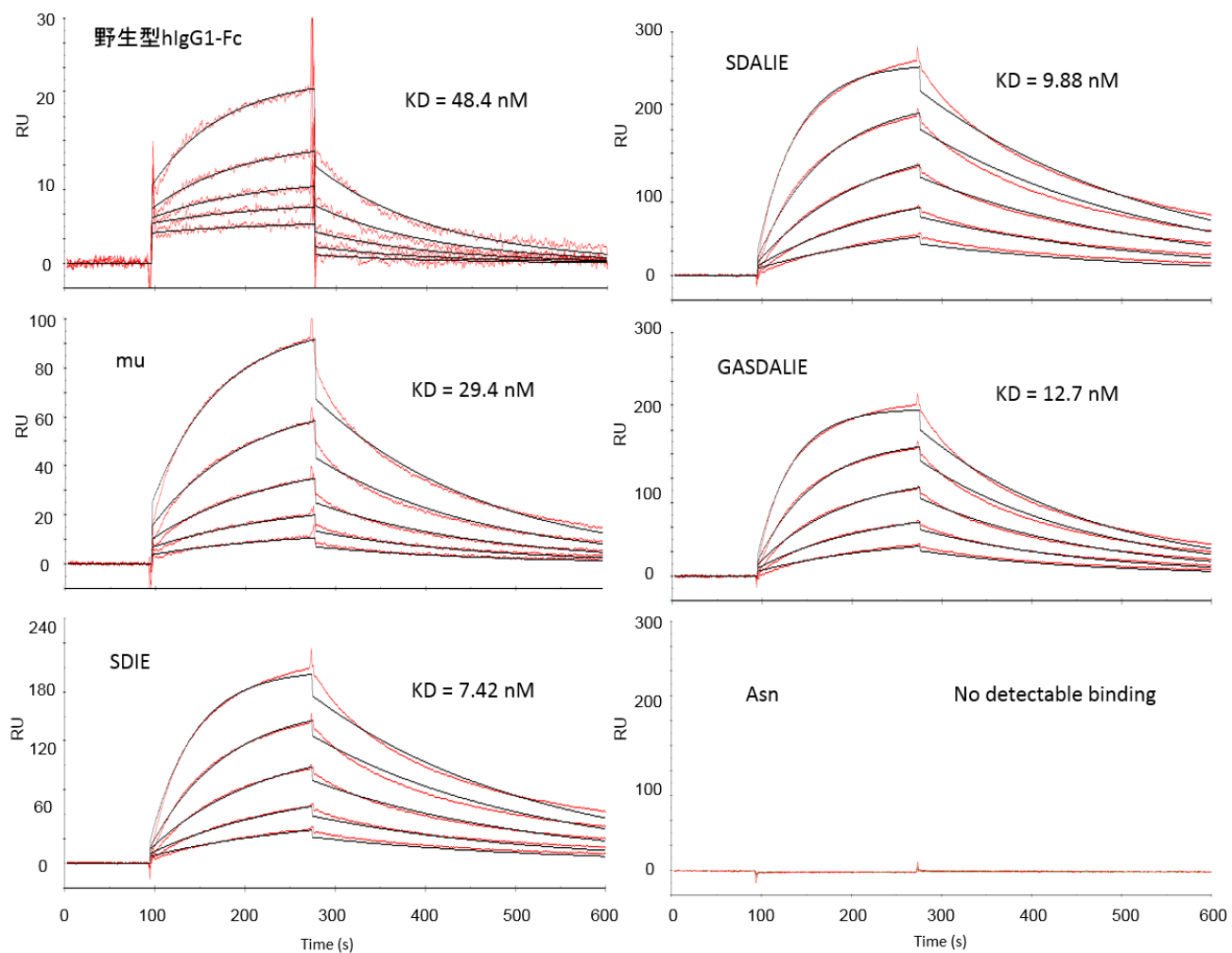


図 3-8D 表面プラズモン共鳴測定によるキメラ抗体のキネティクス解析

FcγRIIIa を固定化したセンサーチップに対して、段階希釈した精製キメラ抗体をアプライした。KD 値は 1:1 (Langmuir) binding model でフィッティングすることにより算出した。

考察

3-9 Cre-In システムの従来技術に対する優位性

本研究では Fc 領域を迅速に改変できる「Cre-In システム」を開発した。DT40 細胞で抗体のキメラ化を行う場合、従来技術では遺伝子ターゲティングにより Fc 領域を改変する手法があるが(Lin *et al*, 2011)、これに対し Cre-In システムでは 2 つの点で大きな優位性がある。すなわちキメラ抗体クローンを得るまでの I) 労力の大幅な低減、および II) 時間の大幅な短縮、の 2 点である。

まず I) に関して、従来の遺伝子ターゲティングの手法による抗体 Fc 領域遺伝子の改変は非常に効率が悪い。実際本研究でも最初にヒト IgG1 キメラ化の際は遺伝子ターゲティングを行っているが、261 株中わずか 2 株と、ターゲッティング効率は 1%以下であり (図 3-1B)、複数のクローンに関して同時並行的に実施するのは現実的とは言えない。一方 Cre-In システムでは、最初こそ遺伝子ターゲティングの手法を用いて DT40 細胞の抗体遺伝子にヒト IgG1 の Fc 遺伝子を導入したが、その際に loxP 配列および lox2272 配列を同時に導入する工夫を行った (図 3-1A)。この工夫によって、①Cre リコンビナーゼ依存的に Fc 領域を改変でき、②Fc 領域が正しく改変された細胞だけを選抜することが可能になった。その理由は、あらかじめ loxP 配列と lox2272 配列で指定した領域に対して組換えを誘導することにより、薬剤選抜後に確実に Fc 領域を改変した抗体を選抜することができるからである。これにより、遺伝子ターゲティング法では必須であった、形質転換後にクローン化を行い、正しく遺伝子が改変された株を選抜する手間を省略することができた。

次に II) に関して、遺伝子ターゲティング法では、ベクター導入後のクローン化に約 1 週間を要する。さらにクローン化した細胞の中から、ドットブロットやジェノタイピングにより陽性クローンを選抜するのにさらなる時間が必要となるため、2 週間近い期間が必要になる。これに対して Cre-In システムでは、ドナーベクターの導入後、最短 5 日

間で Fc 領域改変抗体を発現する DT40 細胞を獲得可能で、遺伝子ターゲティング法の 3 分の 1 程度の期間で作業が完了することになる。こうした迅速性は上記①、②の工夫に加え、DT40 細胞は約 8 時間で倍加するため増殖速度が非常に速い点も大きく寄与しており、Cre-In システムは DT40 細胞特有の優れた性質を最大限に生かす技術といえる。

このように、Cre-In システムは「ADLib システムで得られた抗体の Fc エンジニアリング」という観点で、従来技術の課題を解決できる極めて有用な技術であるが、一方で ADLib システムと Cre-In システムの組み合わせは「特定の抗原に対する抗体作製から Fc エンジニアリングまでのトータルの期間と労力」という観点から見た場合にも、従来の抗体作製技術、例えばハイブリドーマ法を用いるケースと比較して、大きな優位性がある。

ハイブリドーマ法の場合、抗体作製から Fc エンジニアリングによるキメラ化は以下のようなプロセスになると想定される。すなわち①ハイブリドーマの樹立とその重鎖および軽鎖遺伝子配列の決定、②アセンブル PCR による完全長の重鎖遺伝子の作製、③重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子の発現ベクターへのクローニング、④発現ベクターの任意の培養細胞へのトランスフェクション、であり、一連のプロセスは数か月の時間を要すると考えられる(Dang *et al*, 2013)。さらに、複数のハイブリドーマクローンから Fc 改変型抗体を作製する場合には、上記のプロセスを並列に複数実施する必要があり、より煩雑な工程となるであろう。

一方、ADLib システムと本研究で開発した Cre-In システムの組み合わせでは、まず ADLib システムによって 1 週間程度でモノクローナル抗体を作製し、その後の Cre-In システムにより遺伝子導入および薬剤選抜によりわずか 5 日間で Fc エンジニアリングを完遂することが可能となる (図 3-9)。抗体作製から Fc エンジニアリングが継ぎ目なく 2 週間程度の期間で完了することから、ハイブリドーマと比較して圧倒的に迅速である。また作業量も非常に少ないため、一度に多くのクローンに関して試すことも可能である点も、ハイブリドーマ法に対して優位性がある。

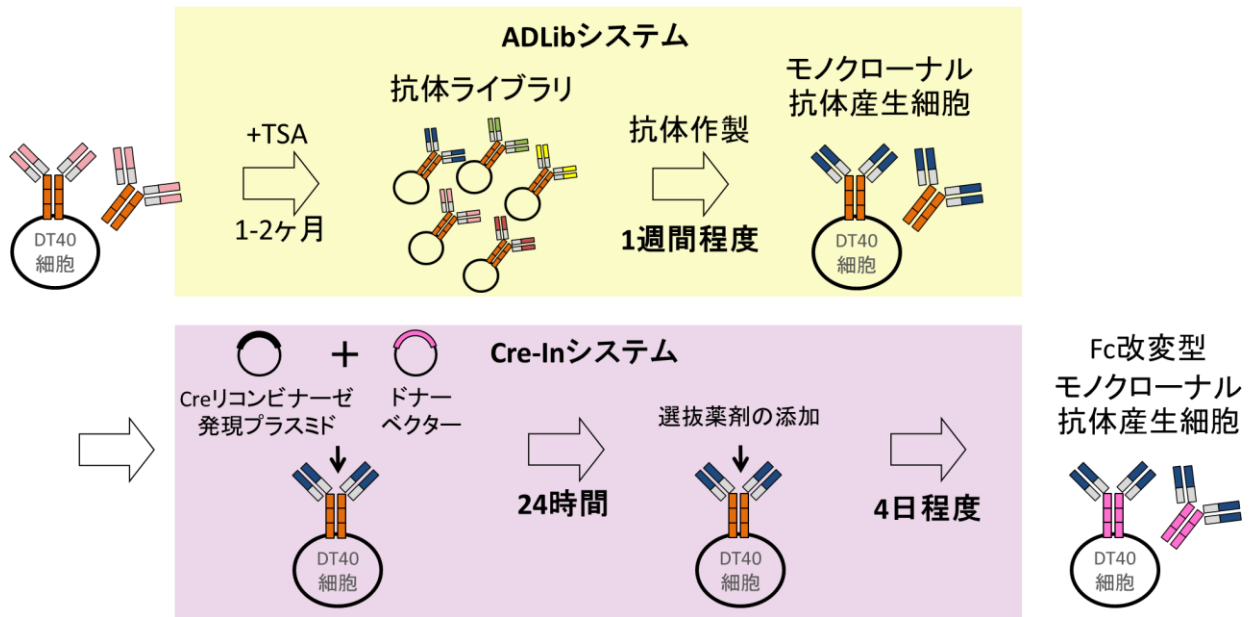


図 3-9 ADLib システムと Cre-In システムを組み合わせたシームレスな抗体技術

ADLib システムによる抗体作製は 1 週間程度、Cre-In システムによる Fc エンジニアリングは 5 日程度で完了する。すなわち、抗体作製と Fc エンジニアリングが同一 DT40 細胞内でわずか 2 週間程度で完了することになる。

3-10 Cre-In システムの実施例

本研究では、Cre-In システムの実施例の蓄積を行った。はじめに、野生型のターミネーター配列をより強力な BGH ターミネーターに置換する実験を行った (図 3-3)。これにより ADLib システムに適するような、DT40 細胞膜上のキメラ抗体の発現量が亢進した細胞の作製に成功した。実際に、Cre-In システムにより BGH ターミネーターを導入した細胞を用いて、EGFR に対するヒトキメラ型およびマウスキメラ型抗体 (図 3-4、図 3-5)、そしてリゾチームに対するヒトキメラ型抗体 (図 3-4) を作製できることを示した。

本研究では抗体エンジニアリングの例として、さらに 2 つの実例を示した。1 つ目は蛍光タンパク質融合抗体の作製である。本実験ではマウス Fc 遺伝子の下流に Citrine 遺伝子を付加した配列を Cre-In システムで導入することで、FACS や蛍光顕微鏡観察で利用可能な「蛍光標識抗体」を迅速に作製することに成功した (図 3-7)。今回は Citrine を使用したが、原理的には EGFP や mCherry 等、ほかの様々な蛍光タンパク質に適用することが可能である。一般に FACS 等の免疫化学的測定系では多重染色を行うことも多いが、抗体の組み合わせによっては二次抗体同士の蛍光波長が重なるなど、二次抗体の選択が難しい場合もある。Cre-In システムを利用すれば融合する蛍光タンパクの変換が容易なため、最適な蛍光標識抗体を自在に作製することが可能となる。

また原理的には、さまざまな免疫アッセイ手法に直接応用可能な抗体を作り出すことが可能である。例えば、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼのような酵素を付加した抗体は、ELISA 等に利用できる抗体として有用であり、診断薬や検査薬として応用が期待できる。多くの診断薬や検査薬はサンドイッチ ELISA を利用しているので、非標識抗体をキャプチャー抗体、Cre-In システムにより酵素標識した抗体を検出用抗体とすることで、同一抗体をベースに簡単にサンドイッチ ELISA を組むことができるであろう。さらには、通常診断薬では検出用抗体を直接酵素標識するが、化学的に共役させる方法では抗体 1 分子に結合する酵素の数や結合部位をコントロールするのは通常不可

能である。例えば抗体の可変領域に結合してしまうと抗原抗体反応を阻害し、また酵素が多数標識されてしまうと非特異シグナルの原因になる。Cre-In システムでは任意の分子数の酵素タンパクを Fc 領域に付加することになるため、抗原抗体反応の阻害や多数の酵素標識による非特異反応増加の懸念はないと考えられ、より高性能な診断薬の開発につながる可能性がある。

2つ目の抗体エンジニアリングの例として、医薬品開発への応用を視野に入れ、ADCC 活性強化抗体の作製を行った。過去にも抗体 Fc 領域にアミノ酸置換の導入や、アスパラギン残基の糖鎖修飾の欠失で、ADCC 活性を強化した例が報告されている(Lazar *et al*, 2006; Richards *et al*, 2008; Shields *et al*, 2001, 2002; Smith *et al*, 2012)。本研究では、Cre-In システムによって ADCC 活性を増強する既知のアミノ酸置換を導入したヒトキメラ抗体を複数作製し、NK 細胞等が発現する受容体である Fc γ RIIIa に対する親和性を改善することに成功した (図 3-8)。本論文で使用した Fc 変異は先行研究で報告されたものであるが、Cre-In システムを応用することで、抗体医薬を高機能化するための新規の Fc バリエーションを探索するツールとしての利用が期待できる。図 3-10A のように、ドナーベクターとして「Fc 変異導入ライブラリ」を Cre-In システムで導入することで、それぞれの DT40 細胞に固有の Fc 変異を含むヒトキメラ抗体を発現させ、スクリーニングに用いることができる。

加えて、ADCC 活性の他にも様々な形で抗体医薬への応用が可能と考えられる。例えば近年、抗体に薬剤を共役させ、がん組織等のターゲットに抗体を介して薬剤を届ける、抗体薬物複合体 (ADC) が注目されている(Wu & Senter, 2005)。抗体の定常領域に特定のアミノ酸配列を導入し、それを介して薬剤を共有結合させる方法が知られているが(Junutula *et al*, 2008)、Cre-In システムを用いれば、こうしたアミノ酸部位の選定および導入が非常に容易になる。また薬剤としてペプチドを抗体に融合した ADC も研究開発が行われているが(Berguig *et al*, 2015)、図 3-10B に示したように、ドナーベクターとして「ペプチド薬剤ライブラリ」を準備し、これを Cre-In システムで導入すれば、「ADC

ライブラリ」を作製することも可能である。それぞれの ADC 候補を発現する細胞クローンから培養上清を回収し細胞毒性試験を実施することで、最適な抗体と薬剤の組み合わせをハイスループットに探索できる系になり得るであろう。

以上のように、本論文で開発した Cre-In システムは、ADLib システムで作製したモノクローナル抗体を迅速に高機能化するツールとして非常に有用である。Cre-In システムを利用して、用途に見合った変異や機能付加を行うことで、医薬品、診断薬、検査薬、研究試薬として有用な抗体の開発に貢献できると考えられる。

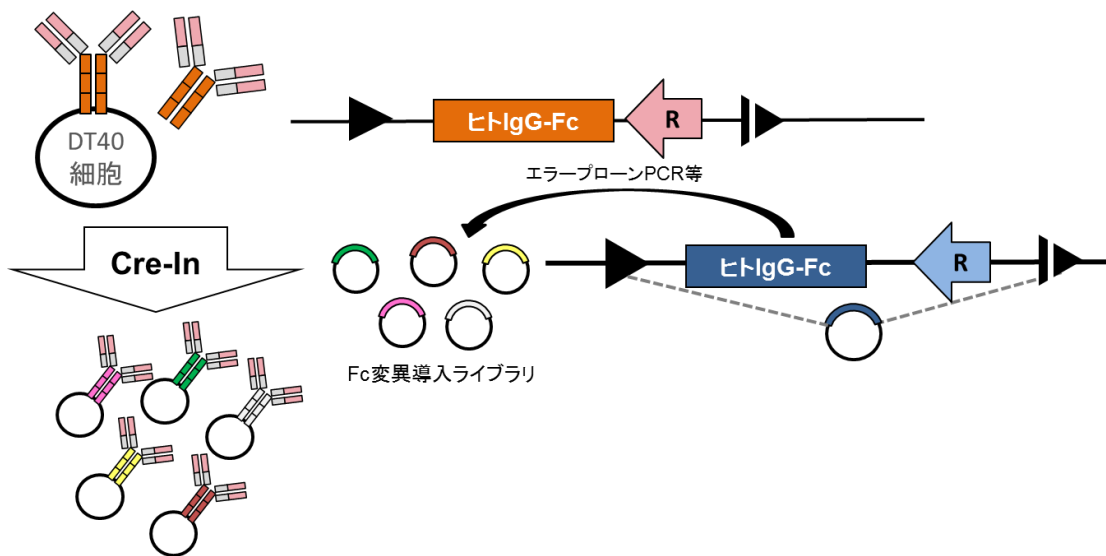


図 3-10A Cre-In システムを応用した高機能 Fc バリエーションの探索

「Fc 変異導入ライブラリ」を含むドナーベクターを準備し、それぞれの DT40 細胞クローンから Fc 変異を有するモノクローナル抗体を発現させることで、機能の優れた Fc 遺伝子を探索するシステムとして利用可能と考えられる。

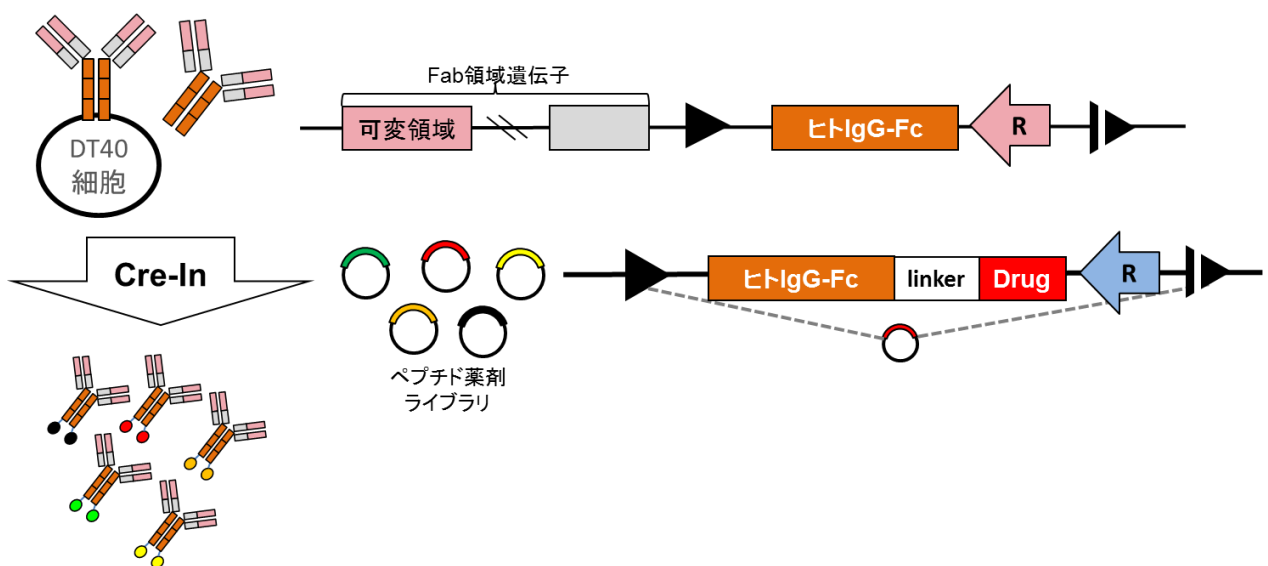


図 3-10B Cre-In システムを応用した抗体薬物複合体ライブラリの構築

「ペプチド薬剤ライブラリ」を含むドナーベクターを準備することで、Cre-In システムを利用した抗体薬物複合体ライブラリ（ADC ライブラリ）を構築することが可能と考えられる。各 DT40 細胞クローンから抗体を回収し機能性試験を行うことで、抗体と相性の良いペプチド薬剤を選択するシステムとしての応用が期待できる。

なお、第 2 章、第 4 章の内容については特許申請予定のため除外している。これらの結果は 5 年以内に出版予定である。