

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 トウイ ズオン グエン

抗体は、標的分子に対する高い特異性・親和性をもつ分子標的医薬として、ニーズが大きく高まってきている。しかし、既存の多くの抗体選択法は、細胞外の酸化的環境下で行うものであり、細胞内の還元的環境下で機能を発揮する抗体 (intrabody) を選択する汎用的な方法は未だ確立されていない。

本論文は、ヒト細胞の環境に近い動物細胞の細胞質において、一本鎖抗体 (scFv) と受容体のキメラ蛋白質を発現させ、受容体由来のシグナル伝達活性を指標として intrabody を抗体ライブラリーから選択する技術の開発を目的とした研究であり、全 5 章から構成されている。

第 1 章は緒言であり、本論文の目的と構成について簡潔に述べられている。

第 2 章は背景であり、既往の研究で報告されている抗体選択法や細胞内で機能する intrabody の選択法についてまとめた上で、本論文で開発する技術の独創性や新規性について論じられている。

第 3 章では、scFv と受容体チロシンキナーゼ c-Kit を連結した増殖シグナル伝達型キメラ受容体を用いた intrabody 選択法について述べられている。導入部では、本章で用いる受容体や、モデル抗原として用いた狂犬病ウイルス核 (N) 蛋白質について述べられており、本論文で開発した intrabody 選択法の原理が示されている。この原理に従って、まず、インターロイキン 3 (IL-3) 依存性マウス細胞株である Ba/F3 細胞に抗原である N 蛋白質を恒常発現させた細胞株を作製した。次に、ヒト合成ナイーブ scFv ライブラリーである Tomlinson I をファージディスプレイ法によって一回パンニングしたライブラリーを c-Kit に連結したキメラ受容体ライブラリー発現レトロウイルスベクターを構築した。作製したライブラリーベクターを抗原発現細胞株に導入し、IL-3 を除去した培地中で選択培養し、キメラ受容体由来の増殖シグナルが伝達されている細胞を選択した。得られた細胞からゲノムを抽出し、scFv 配列を複数同定した。これらの scFv クローンの抗原特異性を検証するために、各 scFv クローンをキメラ受容体発現ベクターに再度組み込み、抗原非発現細胞および発現細胞に導入し、

IL-3 を除去した培地で増殖アッセイを行った。その結果、抗原依存的に増殖誘導するクローン、抗原の有無にかかわらず増殖誘導するクローン、抗原の有無にかかわらず増殖誘導しないクローン、の 3 通りのクローン群に大別された。免疫沈降法を行った結果、抗原依存的に増殖誘導するクローンのみならず、抗原の有無にかかわらず増殖誘導するクローンも抗原結合性を有していることが分かった。そこで、キメラ受容体の抗原非特異的な増殖活性を抑えるために、scFv と c-Kit の間にフレキシブルリンカーを挟んだキメラ受容体を構築して評価した結果、抗原非依存的な増殖活性を抑えることに成功した。以上より、本章では増殖シグナル伝達型キメラ受容体による intrabody 選択法の実証に成功したと述べられている。

第 4 章では、scFv と細胞死誘導型受容体を連結したキメラ受容体を構築し、scFv ライブラリーから抗原非特異的にオリゴマー形成する scFv クローンを除去することで、第 3 章で述べた増殖誘導型キメラ受容体を用いた選択法に供する scFv ライブラリーの質を向上させる手法の開発について述べられている。まず、細胞死に関わる 4 種類のシグナル伝達分子を用いたキメラ受容体を作製して評価した結果、FADD が当該目的を達成するために最も優れていることが分かった。そこで、ナイーブライブラリーと FADD を連結したキメラ受容体発現ベクターを抗原非発現細胞にまず導入し、生き残った細胞からゲノム PCR により回収した scFv ライブラリーを、今度は増殖誘導型受容体 c-Kit に連結したキメラ受容体ライブラリーを作製した。このキメラ受容体ライブラリーを抗原非発現細胞および抗原発現細胞に導入して増殖により選択した結果、抗原非発現細胞と比較して抗原発現細胞にて増殖クローン数の大幅な増加が見られた。この増加率は、増殖誘導型受容体のみを用いた対照群と比べて明らかに大きかった。以上より、本章では、細胞死誘導型キメラ受容体と細胞増殖誘導型キメラ受容体を連続的に組み合わせて選択する手法をとることによって、抗原特異的 intrabody の取得率を上昇させることができる、すなわち偽陽性を低減できることが示されている。

第 5 章は、本論文の総括と今後の展望について述べられている。

以上、本論文では、細胞増殖及び細胞死誘導型キメラ受容体を用い、動物細胞での intrabody 選択法を新規に開発・実証している。この成果はバイオエンジニアリング、特に細胞工学、抗体工学、創薬分野の発展に寄与するところ大である。

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。