

審査の結果の要旨

氏 名 劉 文 海

抗体はその高い抗原特異性を利用して、様々な物質に対する免疫測定系や抗体医薬として用いられており、任意の抗原に対する高い親和性を持つ抗体断片を簡便に得る方法の開発が望まれている。抗原を特異的に認識する抗体の取得法として、動物への抗原の免疫法やファージディスプレイ法が用いられてきた。前者には生体毒性の高い抗原を免疫できない、ハプテン抗原に対する抗体が得られない、抗体取得に数ヶ月かかるなどの問題点が、また、後者には非特異的結合クローンが取れやすく、操作が煩雑といった欠点がある。本論文は、サイトカイン受容体がサイトカインと結合することにより二量体化して細胞増殖シグナルを伝達する機構を参考に、種々の抗体-受容体キメラを構築し、抗原存在下での増殖シグナル伝達活性を評価することにより、抗原依存的細胞増殖の厳密な ON/OFF 制御可能な抗体-受容体キメラの取得を目指したものである。さらに、その抗体-受容体キメラの抗体部分をライブラリー化し、このライブラリーの中から抗原に対して高い結合能を持つ抗体部分を、抗体-受容体キメラを発現する細胞の増殖活性を指標として迅速且つ簡便にスクリーニングする技術の開発を行ったものである。

本論文は、全 7 章から構成されている。

第 1 章では、本論文の目的について述べている。

第 2 章では、本論文の意義を明確にするために、背景について述べている。

第 3 章では本論文で用いた実験材料などについて述べている。

第 4 章では、抗体- erythropoietin receptor (EpoR) キメラの細胞外ドメインおよび細胞内ドメインがシグナル伝達に与える影響について述べている。これまでに構築された抗体-受容体キメラでは、リガンド非添加での増殖(バックグラウンド増殖活性)が見られた。このような抗体-受容体キメラを用いてライブラリー選択すると、抗原非依存的に細胞が増殖する。細胞の生死による抗体-受容体キメラのライブラリー選択を行うためには、バックグラウンド増殖活性が無い抗体-受容体キメラを構築する必要がある。そこで本論文では、モデル系としてサイトカイン受容体の一つである EpoR とフルオレセイン修飾牛血清アルブミン (BSA-FL) に対する抗体の ScFv をベースとして種々の抗体-受容体キメラを構築している。バックグラウンド増殖活性の無い抗体-受容体キメラを構築するために、最初に、EpoR 細胞外ドメインの構成および細胞内ドメインの配向性が、増殖シグナル伝達に与える影響を調べている。すなわち、まず 3 種類の EpoR 細胞外ドメイン構造 (D1 ドメインのみ、D2 ドメインのみ、D1 と D2 両方) を持つ抗体-受容体キメラを構築している。これらの抗体-受容体キメラをベースにして、さらに細胞内ドメインの配向性を変えるために、膜貫通ドメインと細胞内ドメインの間に Ala 残基を挿入した抗体-受容体キメラも構築している。これらの種々の抗体-受容体キメラを細胞膜上に発現させたプロ B 細胞 BaF3 に対して、抗原である BSA-FL に対する細胞の増殖依存性を評価している。その結果、ここで構築した全ての抗体-受容体キメラにおいて、抗原依存的な細胞増殖の厳密な ON/OFF 制御を行うことはできなかったものの、EpoR 細胞外ドメインの構造の違いにより、細胞増殖の抗原濃度依存性が大きく変化することを見出している。さらに、構築した抗体-受容体キメラの細胞外ドメインの異なる部位に

結合する erythropoietin, 抗原, 抗タグ抗体など, 複数のリガンドを使った刺激実験を行い, それぞれのリガンド刺激による抗体-受容体キメラのコンホメーション変化がシグナル伝達に与える影響を, EpoR のシグナル伝達経路にある蛋白質 JAK2, STAT5 と ERK1/2 のリン酸化状況を調べることにより評価している. その結果, 同じリガンドを加えても, 構築した抗体-受容体キメラの種類によってシグナル伝達効果が大きく異なったことから, 抗体-受容体キメラの細胞外ドメインの構造の違いが抗体-受容体キメラの活性に大きな影響を持つと結論づけている. また Ala 残基の挿入によっても抗原に対する細胞増殖の応答性, シグナル伝達効果が大きく変化したことより, 細胞内ドメインの配向性も抗体-受容体キメラのシグナル伝達活性に大きな影響を持つと述べている.

第 5 章では, 構築した EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラから得た知見に基づいて, さらに EpoR 細胞内ドメインを gp130 細胞内ドメインに変えた種々の抗体-受容体キメラを構築している. その中で, ScFv を直接 EpoR 膜貫通ドメインに融合した gp130 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラ Sg が, 抗原による細胞増殖の厳密な ON/OFF 制御を可能とするシグナル伝達活性を持つことを見出している. さらに EpoR 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラの場合と同様に, gp130 細胞内ドメインを持つ抗体-受容体キメラにおいても, EpoR 細胞外ドメインの構造の違いにより細胞増殖の抗原濃度依存性が大きく変化すること, 細胞内ドメインの配向性が抗体-受容体キメラのシグナル伝達活性に大きな影響を与えることを明らかにしている.

第 6 章では, 筋萎縮性側索硬化症の原因変異蛋白質として知られ, 生理的条件下でダイマー状態になるヒト活性酸素消去酵素 (hSOD1) を抗原として使い, キメラ受容体を用いた抗体ライブラリー選択法の実現可能性を検証している. hSOD1 を使って免疫したマウスから, 抗 hSOD1 抗体ライブラリー V_H 鎖と V_L 鎖を増幅して得られた ScFv ライブラリーを, 抗原依存的細胞増殖の ON/OFF 制御が可能であった抗体-受容体キメラ Sg の ScFv 部分と置換して, Anti-hSOD1 抗体-受容体キメラライブラリーを構築している. この抗体-受容体キメラライブラリーを BaF3 細胞膜上で発現させ, hSOD1 を添加して数日間培養し, 抗原依存的増殖を示した細胞クローンの選択に成功している. 取得した細胞クローンの表面上キメラ受容体の発現, および hSOD1 に対する結合性をフローサイトメトリー方法により確認している. さらに, 取得した細胞クローンのゲノム中に挿入されている抗体-受容体キメラ遺伝子から抗体遺伝子を増幅し, この抗体遺伝子発現プラスミドを導入した COS-1 細胞を用いて抗体断片の発現生産を行い, hSOD1 に対する抗体断片結合活性を Sandwich ELISA で評価した結果, hSOD1 に対する結合性を持ついくつかの抗体クローンの迅速かつ簡便な取得に成功したと述べている.

第 7 章では, 本研究のまとめと展望について述べている.

以上, 本論文は, EpoR 細胞外ドメインの構造, 細胞内ドメインの種類と配向性を変えた種々の抗体-受容体キメラを構築し, その中から抗原依存的細胞増殖を厳密に ON/OFF 制御可能な抗体-受容体キメラを選択し, さらに, ScFv 部分をライブラリー化した抗体-受容体キメラを発現する BaF3 細胞の抗原依存的増殖活性を利用して, 抗原結合性を持つ抗体クローンを迅速かつ簡便に取得する新規な技術を開発したものである. これらの成果は, 免疫測定用, 医薬用抗体の開発をはじめとする化学生命工学分野の発展に寄与するところが多い.

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.