

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 稲垣 貴之

本論文では、体外免疫法を用いた抗体の取得方法の開発を目的としている。

抗体は、生体内の免疫反応を担う蛋白質で、特定の物質（抗原）に特異的に結合することができる性質や、他の免疫系の細胞を活性化するなどの様々な働きをする。この性質を利用して、近年では診断薬や治療薬（抗体医薬）として、医療分野でも幅広く利用されている。診断薬や治療薬の開発において、高親和性抗体の迅速な取得は非常に重要な課題であるといえる。抗体の取得においてもっとも時間を要する過程は、抗原を免疫する過程であり、この過程を迅速化する手法として、体外免疫法の活用が考えられる。しかし、既報の体外免疫法では、免疫反応である抗体のクラススイッチを再現性良く誘導できないなどの問題点があった。本論文では、高親和性抗体を取得するために誘導すべき免疫反応として、体細胞変異の蓄積による抗体の親和性成熟に着目し、体細胞変異を再現性良く誘導し、迅速に抗体を取得する手法の開発を目指したものである。本論文は以下の6章から構成されている。

第1章は序論であり、本研究の目的と概要、本研究の背景について述べている。

第2章では、体細胞変異の誘導をモニタリングする指標として、RNA editing enzymeであるActivation-induced cytidine deaminase (AID)の発現誘導と、胚中心様B細胞への分化誘導という2項目に着目し、これらを実現する為のB細胞の刺激方法の検討・解析を行った結果を報告している。抗原としてニワトリ卵白リゾチーム (HEL)を用い、T細胞性の刺激物質としてIL-4、IL-5、抗CD38抗体、抗CD40抗体、T細胞非依存性の刺激物質としてLPSを用いている。

Real time PCRを用いたAID mRNAの発現解析の結果、T細胞性の刺激として上記4種類全てを添加する条件（4種類のT細胞性刺激を全て使用する条件を以下TDSと省略する）で、抗原の有無によるAID mRNA発現量の差異を確認することができ、さらに、LPSを同時に添加することで、大幅に発現量を上昇させることにも成功したと述べている。この条件下で、フローサイトメトリーを用いて細胞の表面抗原を解析した結果、胚中心様B細胞を検出することができたことも述べている。さらにこれまでの体外免疫法の問題点であった再現性を確保し、胚中心様B細胞への分化誘導とAIDの発現誘導を定量的に評価し実現する手法として、LPS+TDS刺激による免疫方法を確立したことを報告している。

第3章では、第2章において確立した体外免疫法を用いた抗体取得方法の確立と、抗原HELの免疫、体細胞変異の誘導確認とanti-HEL抗体の取得を行っている。

確立した体外免疫法を用いて、免疫した細胞からscFvを構築する迅速抗体取得方法

を考案している。構築した scFv を大腸菌で発現させることで、抗体の活性確認まで、免疫開始から約 10 日間と非常に短縮することができ、迅速な抗体取得方法となったと述べている。この手法で得られたクローンの遺伝子配列・アミノ酸配列を解析し、変異が蓄積されていることを確認している。また、得られた抗体の活性を BIACORE にて評価し、scFv として、解離定数 78 nM ($k_{on} : 2.86 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_{off} : 2.33 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) のクローンを得ている。また、本論文で構築した体外免疫方法を用いてハイブリドーマを構築し、抗体をスクリーニングした結果、解離定数 0.5 nM ($k_{on} : 9.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $k_{off} : 5.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) の完全長抗体を得たことも述べている。

第 4 章では、低分子量ペプチド (Angiotensin I, 10mer) を免疫し、特異的抗体のスクリーニングを行っている。本方法では、低分子量ペプチドをキャリアタンパク質にコンジュゲートすることなく直接体外免疫し、低分子量ペプチドに特異的に反応する抗体を取得することに成功したと述べている。

第 5 章では、体外免疫法のもう一つのメリットと考えられる自己抗原の免疫を行っている。マウス由来の自己抗原 S100A10、及びこれと非常にホモロジーの高いヒト由来の S100A10 (ホモロジー91%) を免疫し、動物細胞を用いた通常の免疫法では取得が困難な自己抗原に対する抗体の取得に成功したことを報告している。

また、これらの抗体は、脾臓細胞ではなく、B 細胞を免疫した場合でも同様に取得でき、当初の想定通り LPS+TDS によって T 細胞からの刺激を代替することができたことが示されたと述べている。このことから、培養 B 細胞を用いた免疫も可能であることが示唆され、抗体のレパトリーを保持した培養 B 細胞系統が構築できれば、さらに汎用性の高い抗体取得法となると考察している。

同時に、IgG₁ へのクラススイッチを確認したところ、得られたクローンのうち 50%~90% と非常に高い確率で IgG₁ が取得できており、本法でクラススイッチが誘導できたと述べている

第 6 章は研究の総括である。

以上、本研究ではクラススイッチや体細胞変異を誘導可能な体外免疫法の構築と、それをベースとした抗体取得方法を開発し、様々な抗原に対して利用できる可能性を示している。また本研究で得られた抗体は、腎臓がんの診断薬として利用する応用展開が期待される。また、抗体医薬においては、ヒト生体内での拒絶反応を抑える目的から、ヒト抗体の作製が必要と言われているが、本手法は B 細胞に対して刺激を加えることで免疫反応を誘導しており、ヒト B 細胞を体外免疫することによって迅速にヒト抗体を取得する手法の開発も期待される。このように、本博士論文研究を通じて開発された体外免疫法ならびに迅速抗体取得方法はバイオエンジニアリング分野への貢献が大である。よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格であると認められる。