

論文の内容の要旨

ヒストン脱アセチル化酵素を介した抗体遺伝子多様化機構の解析と 抗体定常領域の迅速改変方法の開発

黒澤 恒平

【序】

B 細胞が分泌する抗原受容体タンパク質は「抗体」と呼ばれ、病原体（抗原）と特異的に結合する性質を有している。近年、その高特異性と高親和性から分子標的治療薬として、抗体は大きな注目を集めている。

品質が均一で、大量生産が可能なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術によって作製される。この技術は、多大な労力と時間を要する点で、改善の余地がある。また、抗体医薬への利用では、体内での抗原性を低減させるため、抗体のヒト化もしくはヒトキメラ化が重要である。この工程も、最終的に長い期間を要する点で、課題が存在する。

抗体は、各 2 本の重鎖と軽鎖が安定的に結合した 4 量体の Y 字型タンパク質であり、可変領域と定常領域に区別することができる。可変領域は Y 字の先端部分に位置し、抗原と直接相互作用する。無数の抗原に対応するための多様化は、主にヒトやマウスでは V(D)J 組換えにより、ニワトリやウサギでは遺伝子変換と呼ばれる DNA 組換えによって担われている。定常領域は、抗体の安定性や生理活性を保証する Fc (fragment, crystallizable) 領域を含む領域である。ヒトでは、重鎖定常領域の差異により、抗体を IgM や IgG など 5 種類に分類可能である。生体内では、クラススイッチと呼ばれる DNA 組換え機構によってクラス変換が行われる。このように抗体遺伝子では、可変領域と定常領域の双方で DNA 組換えが非常に重要な役割を果たす。

近年、抗体遺伝子の DNA 組換えが、クロマチン構造を介して制御されることが明らかになってきた。真核生物の DNA は、クロマチン構造を形成することにより階層的に折り畳まれている。クロマチンの基本構造単位は、ヒストンタンパク質の周りを DNA が 1.75 周巻くヌクレオソームである。また、ヒストンの N 末端領域に存在するリシンなどのアミノ酸残基は、アセチル化、メチル化などの修飾を受ける。これらの修飾は隣り合ったヒストンタンパク質や DNA との相互作用を通じて、クロマチン構造を変化させることが知られている。

これまでに所属研究室では、ニワトリ B 細胞由来 DT40 細胞における抗体遺伝子とクロマチン構造の関係について研究が行われてきた。DT40 細胞は、膜型および分泌型 IgM 抗体を産生する。また、低頻度ながら抗体遺伝子で遺伝子変換が恒常的に行われている。動物細胞としては例外的に相同組換え頻度が高いといった特徴を有している。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のトリコスタチン A (TSA) で DT40 細胞を処理することで、抗体遺伝子の遺伝子変換を人為的に促進することが可能になった。また、ヒストン脱アセチル化酵素の一つ、*HDAC2* 遺伝子をノックアウトした DT40 細胞 (*HDAC2*^{-/-}) においても遺伝子変換が促進されることが示された。

さらに所属研究室では、TSA 依存的に多様化した抗体遺伝子レパトアを有する B 細胞集団を作出し、その中から任意の抗原に対する特異抗体を産生する B 細胞クローンを獲得するシステム (Autonomously Diversifying Library system, ADLib システム) の開発に成功している。このシステムは完全な試験管内モノクローナル抗体作製系になっており、1 週間程で抗体産生細胞を獲得することができる。さらに、ニワトリ IgM とニワトリ/ヒトキメラ IgG 抗体を同時に発現する DT40 細胞株を遺伝子工学的に構築し、迅速にキメラ IgG 抗体を作製するシステムが開発された。しかしながら、この細胞株を作製するにあたって、抗体定常領域の遺伝子ターゲティングの効率が 0.2% (通常 50% 程度) と非常に低く、株作製に時間がかかるといった課題が存在していた。

これらの背景のもと、本研究は、「抗体遺伝子多様化制御機構の解明と、有用抗体の自在作出」を究極的な目標に、DT40 細胞を用いて実験を行った。前者は抗体の可変領域に注目した研究であり、後者は抗体の定常領域に注目した研究である。

はじめに、*HDAC2* とそれに酷似した *HDAC1* に注目した。その後、逆遺伝学的手法を用いて両タンパク質の機能を比較した。さらに、前述の実験とともに DT40 細胞を使った有用抗体の作製も試みた。DT40 細胞の Fc 領域を迅速に改変することができる技術の開発に取り組み、その後、融合抗体の作製を行った。

【結果及び考察】

抗体遺伝子可変領域の多様化に関するヒストン脱アセチル化酵素の機能

HDAC1 遺伝子および *HDAC2* 遺伝子をノックアウトした DT40 (*HDAC1*^{-/-} および *HDAC2*^{-/-}) を用いて、各種表現型に関して解析を行った。その結果、*HDAC1* と *HDAC2* は細胞増殖および TSA 依存的アポトーシス誘導経路において異なる役割を果たすことが明らかとなった。また、一

部のリシン残基の脱アセチル化に対して、基質特異性が異なることが示された。さらに、抗体遺伝子の転写量と多様化頻度を比較した。その結果、HDAC1 と HDAC2 が抗体遺伝子の転写や多様化の制御において、異なる機能を分業していることが明らかになった。

次に、その機能分担の機構を調べた。可能性としては、1)HDAC1 および HDAC2 の構造上の相違、または 2)HDAC1 と HDAC2 の発現量の違い、という 2 つの可能性が考えられた。1)の可能性について検証するために、*HDAC1*^{-/-}の内在性 HDAC2 遺伝子の各領域を、HDAC1 のそれと交換した細胞株を構築した。その後、構築した細胞株と *HDAC2*^{-/-}の表現型を比較し、HDAC1 と HDAC2 の「構造的な違い」の重要性を調べた。その結果、相同性が高い N 端側の HDAC コアドメインを含む領域の違いが、抗体遺伝子軽鎖の転写制御に影響することが明らかとなった。

次に、2)の「HDAC1 と HDAC2 の発現量の違い」について検証した。まず、両遺伝子のプロモーターが有する転写活性の違いを比較した。その結果、HDAC1 プロモーターの転写活性が HDAC2 のそれと比べて 1/3 程度であることがわかった。つまり、*HDAC2*^{-/-}で発現している HDAC1 に比べ、置換株のキメラ HDAC1 タンパク質の発現量が多いことが示唆された。そこで、キメラタンパク質の発現量を抑制した置換株を構築し、各種表現型を再度検証した。その結果、抗体遺伝子重鎖の転写に関しては、N 端側領域の構造的な違いに加え、発現量の違いも、機能分業に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

このように、本研究では DT40 細胞を使った逆遺伝学的手法によって、今まで検証されてこなかった HDAC の構造的相違と発現量の違いの両者が、機能分業に複合的に関与することを明らかにすることができた。今後、抗体遺伝子制御だけにとどまらず、がん発症などにおける HDAC の機能分業を理解する上で、1 つの重要な知見が得られたことになる。

さらに本研究では、*HDAC1*^{-/-}と *HDAC2*^{-/-}を ADLib システムに適用し、抗体ライブラリーとして *HDAC2*^{-/-}の方が *HDAC1*^{-/-}に比べて優れていることを示す結果を得た。

抗体定常領域の迅速改変方法の開発

DT40 細胞の抗体重鎖定常領域における遺伝子ターゲティング効率が低いという問題を克服するために、本研究では Cre/loxP システムを用いた。

はじめに、野生型 DT40 細胞の IgM-Fc 領域をコードするエキソンの上流にあるイントロン領域に、loxP 配列および loxP2272 配列で挟んだヒト IgG-Fc 領域をコードする配列を、遺伝子ターゲティング方法によりノックインした。この株では、選択的スプライシング機構により、膜型および分泌型ニワトリ IgMに加え、分泌型ニワトリ/ヒトキメラ IgG 抗体が同時に発現していることを確認した。その後、この細胞株から ADLib システムを用いて抗 EGFR 抗体産生細胞を獲得した。

次に、loxP 配列および loxP2272 配列で挟んだマウス IgG-Fc 領域をコードする配列を持ったプラスミド(ドナープラスミド)を構築した。その後、このプラスミドと Cre リコンビナーゼ発現プラスミドを上記の抗 EGFR 抗体産生細胞に共導入した。遺伝子導入した細胞集団を 24 時間培養した後、培養液に選抜用の薬剤を添加しさらに 48~72 時間以上培養した。この

操作によって、Cre リコンビナーゼ依存的に標的の loxP サイトで DNA 組換えを起こした細胞のみが生き残る。薬剤存在下で培養した細胞の培養上清中にはヒトキメラ IgG の代わりに、EGFR に特異的に結合するマウスキメラ IgG が分泌していることを確認した。

次に、抗体 Fc 領域の C 末端側に機能性タンパク質を融合した抗体の作製を試みた。ルシフェラーゼ (GLuc) もしくは蛍光タンパク質 (Citrine) をコードする配列をマウス IgG-Fc をコードする配列と融合し、ドナー配列とした。その後、上述した方法に従って抗 EGFR 抗体産生細胞に対して遺伝子導入を行い、薬剤選抜を行った。薬剤選抜後に、EGFR に特異的に結合するマウスキメラ IgG 抗体が上清中に発現していることを確認した。さらに、Gluc 融合抗体は基質特異的に発光し、Citrine 融合抗体は励起光依存的な発光を示した。

これらの結果から、Cre/loxP システムを利用することで、短時間で効率的に Fc 領域を改変することができることが示された。また、ADLib システムと組み合わせることで、従来法に比べ格段に速いスピードで抗体をデザインし、生産することが可能となった。