

論文審査の結果の要旨

氏名 藤野 泰寛

医療用モノクローナル抗体の普及と同時に、抗体を効率よく探索・最適化する技術の重要性が高まっている。蛋白質ディスプレイ技術は抗体の探索技術のみならず最適化技術としての応用が可能であり、医療用モノクローナル抗体の開発研究において重要な役割を果たしている。無細胞翻訳系を利用したリボゾームディスプレイは大規模な抗体ライブラリにアクセスできるという強みを持つ一方で、RNA 分解酵素等の影響を受けやすいため系が不安定であるという課題をもつ。本論文は、再構築型の無細胞翻訳系で安定化したリボゾームディスプレイで抗体創薬研究において研究効率が高い Fab の分子形を扱う技術 (Fab-PRD) の開発とその応用例について述べたものであり、緒言、材料と方法、結果と考察、総合考察の 4 章より構成されている。

第 1 章は緒言であり、研究の背景が述べられている。ここでは抗体分子の構造と各ドメインの役割を整理し、scFv の分子形と Fab の分子形の比較を通して IgG 創薬研究を Fab の分子形で実施することの優位性に着目した。また抗体研究で活用されている他の蛋白質ディスプレイ技術とリボゾームディスプレイの強みと弱みを比較し、これまで不可能とされてきた Fab の分子形でのリボゾームディスプレイの有用性を指摘した。さらに、この技術を開発するために、無細胞翻訳系として再構築型の PURE system の採用が重要となる点や Fab-PRD で用いる DNA 断片の具体的な設計について事前に考察した。Fab-PRD の応用例として抗体親和性エンジニアリングを想定し、過去に報告されてきた手法とその成績を再確認することで、親和性エンジニアリングにおけるライブラリ設計の重要性に着目した。その結果、これまでのライブラリ設計の主流であった CDR ランダム化や error-prone PCR による確立論的なライブラリ設計に対し、CDR における 1 アミノ酸置換で親和性向上に貢献しうるものを網羅的に探索しそれらを組合せることで個々の抗体ごとにライブラリを設計するカスタムライブラリ戦略の優位性を指摘した。

第 2 章では実験に用いた材料と方法、第 3 章では実験の結果と考察が述べられている。前半の Fab-PRD の技術開発では、2 つのモデル Fab を用いた基礎実験を実施した。Fab-PRD における Bicistronic 型と Monocistronic 型の 2 つのディスプレイ方式の濃縮倍率を比較した結果、Monocistronic 型 Fab-PRD が高い性能を示すことを見出した。その理由としてディスプレイ複合体の配向性や L 鎖・H 鎖の合成が同期しやすい点を指摘した。その後 Monocistronic 型 Fab-PRD にフォーカスして回収率の測定と最適化を実施した。ここでは SecM 配列によるリボゾームストールの不完全性に着目し、SecM 配列を 2 コピーにすることで回収率を向上させることに成功した。また RT-PCR で回収するアンプリコンの検討で

は、全長回収ではなく重要な遺伝情報を含むコア領域だけを回収する戦略を採用することで、より安定した回収を実現した。これらの最適化の結果、1 ラウンドあたりの濃縮倍率が 1000 倍以上、検出感度に関しては投入 RNA 10^{12} 分子中に含まれる 400 分子を回収できる系の開発に成功した。

後半の Fab-PRD の応用例では、Kd が 7.3nM のモデル Fab の親和性エンジニアリングに挑戦した。ここでは、Fab-PRD と 1 アミノ酸置換変異体ライブラリを組合せて、次世代シーケンス技術による CDR 領域の変異スキャンを実施し、濃縮比 (Enrichment Ratio) を指標に親和性向上に有用と思われる 1 アミノ酸置換を非常に効率よく同定した。これらの 1 アミノ酸置換は実際に親和性の測定実験に基づいて同定されたわけではないため、ある程度のノイズを含む可能性がある。しかし、変異スキャンで同定した 1 アミノ酸置換を組合せたカスタムライブラリを合成し、ここから 2000 倍以上親和性が向上した変異体を単離することに成功した。これにより変異スキャンデータを基に選抜した 1 アミノ酸置換が親和性向上に十分貢献していることを証明した。これらの結果から抗体の親和性エンジニアリングにおいて Fab-PRD の有効性を十分示すことに成功した。

第 4 章では総合考察を行い Fab-PRD 技術の今後の展望を議論した。この中で Fab-PRD が本来は大規模ライブラリへのアクセシビリティを強みとする技術であることを前提に、ナイーブライブラリ技術への応用の可能性や、高品質なナイーブライブラリを構築する技術としての可能性、またファージディスプレイやイーストディスプレイ等他の蛋白質ディスプレイ技術と連携しながら Fab-PRD を活用していくための戦略を議論した。

以上、本論文は独創的なアプローチによって、蛋白質ディスプレイ技術による抗体エンジニアリング研究の新しい手法を開発したもので、学問上、応用上貢献するところが少なくない。よって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。

以上 2087 字