

氏名	梶田 真道		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	工学		
学位授与番号	博甲第4145号		
学位授与の日付	平成22年 3月25日		
学位授与の要件	自然科学研究科 機能分子化学専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文の題目	Efficient affinity maturation of antibodies by point mutation using hypermutating chicken B cell line (変異能力を有するニワトリ B 細胞株を用いる点突然変異による効率的な抗体の親和性成熟)		
論文審査委員	教授 大森 齊	教授 酒井 裕	教授 中西 一弘

### 学位論文内容の要旨

申請者の研究室では、ニワトリ B 細胞株 DT40 を用いた *in vitro* 抗体作製システムの開発を行っている。DT40 は 1.動物細胞では例外的に標的相同組み換え頻度が高く、遺伝子操作が容易である、2. 培養中において抗体可変部遺伝子に自発的に変異を導入し、継続的に抗体の特異性を変化させ続ける、というユニークな特徴を持つ。DT40 を用いた抗体ライブラリの作製と適切な選択システムを利用し、目的のクローンを取得するサイクルを繰り返す事で、生体内の抗体の親和性成熟を再現し、効率よく高親和性モノクローナル抗体を作製できると考えた。申請者の研究室では特異性を安定して保持したクローンを単離するため、抗体遺伝子への変異導入を任意に ON/OFF 制御可能な細胞株 DT40-SW を樹立した。これまでに、変異導入が起こる状態にして得た抗体ライブラリから各種抗原特異的抗体を取得でき、変異と選択の繰り返しにより親和性成熟も可能であることを示した。DT40 細胞で起こる主な変異は、最大数百塩基の置換による遺伝子変換であるが、親和性成熟には、より精密な構造の変化が期待できる点変異が有利である。本研究では、DT40-SW を用いた抗体作製システムでの親和性成熟を効率化するため、変異導入様式を遺伝子変換から点変異にスイッチできるシステムを検討し、高親和性抗体の取得を試みた。

(1) DT40 細胞において、遺伝子変換に必須の因子の一つである XRCC3 を欠損すると点変異型になることが知られている。我々は、XRCC3 遺伝子をヘテロ欠失させた DT40 細胞では、ホモ欠失体に見られる増殖遅延が無く、遺伝子変換と点変異の両方を変異が誘発されることを見いだした。そこで、DT40-SW 抗体ライブラリより得た、ハプテン NP に特異的なクローンから XRCC3 ヘテロ欠失体を作製し、再度変異を導入して親和性成熟を試みた。得られたクローンの親和性を ELISA とフローサイトメーターで検討した結果、XRCC3(+/-)クローンでは、野生型より効率的に高親和性のクローンの取得が可能であった。さらに、ELISA によって  $K_D$  値の算出を行ったところ、最も高親和性な抗体を産生する XRCC3(+/-)クローンは元の NP 特異的クローンに比べて、抗原に対して 600 倍の結合力を示す抗体を産生することがわかった。XRCC3 が野生型の場合に比べてヘテロ欠失した方が、NP に対して結合性の向上したクローンを効率よく単離することができた。簡便なヘテロ欠失体作製による XRCC3 発現制御は、親和性成熟に有用であると考えられる。

(2) より簡便な XRCC3 発現制御システムを構築するため Tet-Off システムによる XRCC3 発現の制御を検討した。DT40-SW の内在性 XRCC3 を破壊し、tet-promoter で発現制御できるヒト XRCC3 遺伝子を導入した新規細胞株、DT40-SW-hXR を作製した。DT40-SW-hXR の変異機構を ON にし、抗体軽鎖への変異導入を開始したところ、Doxycyclin(Dox)非存在下では XRCC3 の発現が制御されて点変異導入型に変化していた。DT40-SW-hXR の活用は、高親和性抗体を効率よく取得する上で有用であると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

申請者の研究室では、ニワトリ B 細胞株 DT40 を用いた *in vitro* 抗体作製システムの開発を行っている。DT40 は抗体可変部遺伝子に自発的に変異を導入し、抗体ライブラリを形成する。このライブラリから目的とする抗体を産生するクローンを単離し、抗原特異性を安定に保持するため、抗体遺伝子への変異導入を任意に ON/OFF 制御可能な細胞株 DT40-SW が樹立された。DT40-SW 細胞を用いると、変異導入と選択のサイクルを繰り返すことにより、生体内の抗体の親和性成熟と同様に、効率よく高親和性モノクローナル抗体を作製できる可能性がある。DT40 細胞で見られる主な変異様式は、遺伝子変換であるが、親和性成熟には、より精密な構造の変化が期待できる点変異が有利である。本研究では、DT40-SW を用いた抗体作製システムでの親和性成熟を効率化するため、変異導入様式を遺伝子変換から点変異にスイッチできるシステムを模索し、親和性成熟の効率化を試みた。

(1) DT40 細胞において、遺伝子変換に必須の因子の一つである XRCC3 を欠損すると点変異型になることが知られている。我々は、XRCC3 遺伝子の一方を欠失させた DT40 細胞では、両方の欠失体に見られる増殖遅延が無く、遺伝子変換と点変異の両方を変異が誘発されることを見いだした。そこで、DT40-SW 抗体ライブラリより得た、ハプテン NP に特異的なクローンから XRCC3(+/-) 欠失体を作製し、親和性成熟を試みた。XRCC3(+/-) クローンの方が野生型より効率的に高親和性のクローンの取得が可能であった。この方法による XRCC3 発現制御は、親和性成熟の促進に有効である。

(2) Tet-Off システムによる XRCC3 発現の条件的制御を検討した。DT40-SW の内在性 XRCC3 を破壊し tet-promoter で発現制御できるヒト XRCC3 遺伝子を導入した新規細胞株、DT40-SW-hXR を作製した。DT40-SW-hXR を Doxycyclin 存在下で培養すると XRCC3 の発現が抑制され、点変異型に変化していた。

以上のように、申請者は DT40-SW 細胞を用いる効率的 *in vitro* 抗体作製システムを更に高機能化し、親和性成熟を効率よく進行させる技術を確立した。この方法は、抗体医薬などの候補抗体を取得するためにきわめて有用であり、博士の学位に値する研究であることを認定する。