

平成23年 5月13日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21760641

研究課題名 (和文)

抗体医薬開発への応用をめざしたニワトリモノクローナル抗体作製系の開発

研究課題名 (英文)

Establishment of a novel chicken monoclonal antibody generation system for applying to antibody drug development.

研究代表者

曲 正樹 (MAGARI MASAKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：50359882

研究成果の概要 (和文)：

近年、抗体は研究用試薬や抗体医薬としての利用価値が高まっている。そのため、抗体作製に関する研究は重要な分野である。そこで、本研究ではニワトリを利用する新規なモノクローナル抗体作製システムの開発することを目的とした。そのために、ニワトリ B 細胞株 DT40 を親株とし、抗体遺伝子とチミジンキナーゼ遺伝子をノックアウトする事により、ハイブリドーマ作製に必要な新規ニワトリ細胞融合株を樹立した。

研究成果の概要 (英文)：

Monoclonal antibodies have recently proven to be research reagents and biopharmaceuticals. Thus, it has become increasingly important to develop technologies to obtain a desired antibody. In this study, I aim to establish a novel system for generating chicken monoclonal antibody. To end this, I establish a novel fusion partner cell line from chicken B cell line DT40 by targeted disruption of immunoglobulin and thymidine kinase genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞工学, 免疫学, 抗体工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：モノクローナル抗体, ハイブリドーマ, ニワトリ, 抗体医薬

1. 研究開始当初の背景

抗体は生体内で病原体排除を担う免疫応

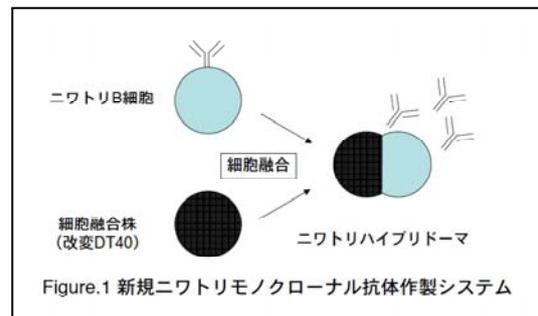
答において重要な分子であるが、その抗原認識の厳密性を利用し、現在では基礎研究から製薬分野を含む応用分野まで幅広く利用されている。しかし、目的の抗原に対する高性能な抗体を効率よく作製するための万能なシステムは未だ開発されておらず、抗体作製に関する課題は重要な研究分野である。一般に、ヒトのガン治療などに用いられる抗体医薬の標的分子は、多くの場合、動物種間で相溶性が高い。通常、マウス等に抗原を免疫すると、生体に備わる優れた免疫反応が働き、抗体の多様化と高親和性クローンの選択に基づく抗体の親和性成熟により高親和性抗体産生B細胞が生じる。しかし、生物種間で相溶性の高い抗原の場合、免疫寛容が働き不応答性となる。この問題により、抗体医薬のシード分子を単離する上で、マウスに標的抗原を免疫し、細胞融合によりハイブリドーマを作製する現行の手法には限界がある。一方で、フェージディスプレイ法に代表される免疫寛容の制限を受けない *in vitro* 抗体作製システムも利用されている。このシステムは、免疫寛容の問題を克服しているため有用であるが、系自体に変異導入機構が存在しないため、得られる抗体は初期の抗体ライブラリに依存している。そのため、生体内の免疫反応を利用する場合と比較し、高親和性抗体を取得するためには多大な労力を要する。それゆえ、効果的なモノクローナル抗体作製には、両者の長所を併せ持つ、免疫寛容を回避可能な動物を利用しハイブリドーマを作製する手法が有用であると考ええる。そこで、申請者は、以下の理由により鳥類、特にニワトリに着目した。

(1) 鳥類は、生物の進化過程において初期段階で分化しているため、マウス等の動物と比較し、ヒトとの主要分子の相溶性は低く、免疫寛容の問題を解決できる可能性を持つ。

(2) 鳥類は、抗体を介する免疫応答をもつが、ほ乳類とは異なる免疫システムを持つ。

(3) 免疫応答に関与する抗体のレパートリー自体がほ乳類のそれとは異なる。

以上より、ニワトリを利用することが、高性能な候補抗体を取得する上で有用であると考えられる。そこで、ニワトリモノクローナル抗体取得に必要な、ニワトリ由来の細胞融合株を開発する。(Figure.1)



2. 研究の目的

DT40 を細胞融合株に改変するためには、DT40 自身の発現する抗体分子を欠損し、細胞融合後にニワトリハイブリドーマのみを選べる選択マーカーを導入する必要がある。そのために、下記に示す分子の発現を制御し性質を検討する事を目的とする。更には、実際に免疫したニワトリより調整した脾臓細胞と細胞融合を実施する事によりハイブリドーマの作製について検討する事を目的とする。

(1) DT40 は、抗体遺伝子への変異導入のキーマーカである activation-induced cytidine deaminase (AID) 依存的に継続的に抗体遺伝子に変異を導入し続ける。そのため、細胞融合後のハイブリドーマの抗原特異性を安定に維持するため、抗体遺伝子への変異導入能力を不活化させる必要がある。そこで、申請者の研究室にて樹立した、AID 発現の ON/OFF を自在に制御することが出来る細胞株 DT40-SW を利用する。

(2) DT40 は、IgM クラスの抗体を細胞表面に発現すると共に、培養上清中に分泌している。そこで、DT40-SW 由来の内因性の抗体分子の発現を抑制するため、DT40-SW の抗体遺伝子をノックアウトする。

(3) 細胞融合を行った後、融合細胞のみを選択するためのマーカーが必要となる。核酸合成系酵素である thymidine kinase (TK) 遺伝子欠損により、hypoxanthin、aminopterin、thymidine を含む HAT 培地中では生育出来ないことが知られており、選択マーカーとして有用である。そこで、DT40 の TK 遺伝子を不活化する。

(4) 上記により作製した細胞株について、HAT 培地への感受性について検討する。

(5) ニワトリに抗原 (TNP-KLH) を接種し、免疫応答を誘導した後、脾臓細胞を摘出し、細胞融合を行う。

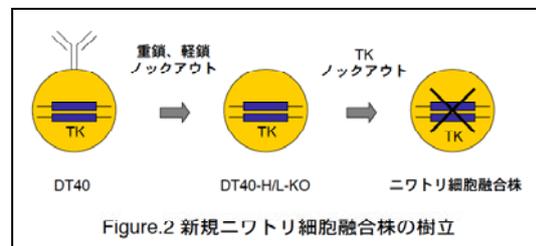
3. 研究の方法

新規ニワトリ細胞融合株を作製するため、以下の計画に基づき研究を進めた (Figure. 2)。

(1) 抗体重鎖および軽鎖欠損 DT40 の作製
DT40-SW の抗体重鎖および軽鎖を破壊するため、異なる薬剤耐性遺伝子を組み込んだノックアウトベクターを作製し、エレクトロポレーション法により、連続的に DT40-SW に導入した。薬剤にて選択した後、抗体重鎖および軽鎖遺伝子が破壊できたクローンを genomic PCR 法を用いて選択した。また、mRNA の発現を RT-PCR 法により確認し、抗体重鎖、軽鎖欠損細胞 (H/L-KO) を取得した。H/L-KO では抗体遺伝子欠損しており、表面と分泌型の IgM 抗体の発現の消失が予想されるため、細胞表面 IgM の発現をフローサイトメーターを用いて、更に、分泌型抗体を ELISA 法にて検討した

(2) ニワトリ細胞融合株の樹立

細胞融合選択に必要なマーカー導入のため、TK 遺伝子欠損 H/L-KO を作製した。(1) で作製した H/L-KO の TK 遺伝子を破壊するため、2 種類の薬剤耐性遺伝子を組み込んだノックアウトベクターを作製し、エレクトロポレーション法を用いて H/L-KO に導入した。薬剤耐性遺伝子に対する抗生物質とチミジンアナログを利用して目的細胞を選択した。目的細胞は、チミジンアナログを核酸の基質として取り込めないため、生育可能である。樹立した細胞株を DT40-FP と呼ぶ。DT40-FP は、目的の細胞融合を行う事により、HAT 培地中で生育可能となると考えられる。



(3) ニワトリハイブリドーマ作製の検討

モデル抗原として、人工ハプテン TNP を結合したヘモシアニン (TNP-KLH) を静脈より免疫する。経時的に血清を回収し、抗 TNP IgG 抗体価の上昇を ELISA 法を用いて確認する。3 週間ごとに免疫を行い、3 次免疫後、7 日目に脾臓を摘出する。採取した脾臓より細胞懸濁液を調整し、作製した DT40-FP 細胞との細胞融合を行った。融合方法として、PEG 法と電気融合法を用いた。

4. 研究成果

(1) ニワトリ細胞融合株の樹立

まず、抗体遺伝子ノックアウト株を樹立するため、抗体重鎖可変部遺伝子を薬剤耐性マーカー (プラストサイジン S 耐性遺伝子) に置き換える事によりノックアウトベクターを作製した。その後、DT40-SW にエレクトロポレーション法を用いて導入し、薬剤耐性クローンを選択し抗体重鎖ノックアウト細胞を作製した。同様の手法を用いて抗体軽鎖遺

伝子のダブルノックアウト株を作製した。この細胞での抗体発現をフローサイトメーターおよびELISAを用いて解析した結果、表面IgM抗体の発現および培養上清中へのIgM抗体の産生が見られなかった。

次に、チミジンキナーゼ遺伝子のノックアウトベクターを作製するため、エキソン5の上流(約1kBps)および下流(約2kBps)の遺伝子断片をPCR法を用いて取得した。更に、取得した遺伝子断片を用いて、2種類の薬剤耐性マーカーを持つチミジンキナーゼノックアウトベクターを作製した。次に、(1)で樹立した抗体遺伝子欠損DT40-SWにエレクトロポレーション法を用いてノックアウトベクターを連続的に導入し、チミジンキナーゼ欠損株を取得した。

取得したチミジンキナーゼ欠損株をHAT培地およびチミジンのアナログであるBrdUを含む増殖培地で培養したところ、野生型のDT40はHAT培地中で生育可能であったのに対し、今回樹立したチミジンキナーゼ欠損株は増殖できなかった。逆に、BrdUを含む培地中では、チミジンキナーゼ欠損株のみ生育可能であった。

さらに、新規細胞融合株の長期培養においてもその性質は保持されており、リバータントも認められなかった。

以上の結果は、今回樹立したDT40改変株がニワトリハイブリドーマ作製のために必要な選択マーカーを持つ事を示す。また、現在までの変異誘導剤を用いる細胞融合株樹立とは異なり、非常に安定な性質を持つ事から、新規性が高い。

(2) ニワトリハイブリドーマ作製

ニワトリハイブリドーマ作製のために、まず、抗原としてTNP-KLHをニワトリの静脈より3週間おきに3回投与した。その後、経時的

に血清を採取し、抗TNP抗体価をELISA法を用いて測定したところ、免疫に伴い抗TNP IgG抗体価が上昇しており、ニワトリ体内で免疫応答を誘導できた。

次に、十分に抗体価の上昇したニワトリの脾臓細胞を調整し、(1)で樹立した新規細胞融合株と細胞融合を行った。その結果、細胞融合直後に、染色体数の増加した細胞集団をPI染色とフローサイトメーターにより検出した。しかし、マウスハイブリドーマ作製系と比較し、ニワトリハイブリドーマの融合効率および、コロニー形成率が低かった。そのため、今回樹立した新規細胞融合株の更なる改良および細胞融合条件を最適化する必要がある。

以上の結果より、本助成研究において、ニワトリハイブリドーマ作製に必要な新規な細胞融合株の親株を作製した。今後、細胞融合法の最適化等により、より有用性の高い抗体作製系の基盤技術なる事が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Kajita, M., Okazawa, T., Ikeda, M., Todo, K., Magari, M., Kanayama, N., Ohmori, H., Efficient affinity maturation of antibodies in an engineered chicken B cell line DT40-SW by increasing point mutation. *J. Biosci. Bioeng.* **110**: 351-358. (2010) (査読有)

② Magari, M., Kanehiro, Y., Todo, K., Ikeda, M., Kanayama, N., Ohmori, H., Enhancement of hypermutation frequency in the chicken B cell line DT40 for efficient diversification of the antibody repertoire.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **396**:
353-358. (2010) (査読有)

③ Kajita, M., Magari, M., Todo, K.,
Kanayama, N., Ohmori, H.,
Conditional transformation of
immunoglobuline mutation pattern from gene
conversion into point mutation by
controlling XRCC3 expression in the DT40 B
cell line. *J. Biosci. Bioeng.* **107**:
206-209. (2010) (査読有)

[学会発表] (計4件)

① N. Kanayama, S. Kojima, S. Fujii, K.
Kitamura, K. Inoue, N. Okayama, S. Matsuda,
Y. Kanehiro, K. Todo, M. Magari, H. Ohmori,
Affinity maturation of a mouse monoclonal
antibody in an in vitro antibody
generation system using the hypermutating
chicken B cell line, 14th International

Congress of Immunology, Aug 23-17, 2010,
Kobe

② 曲正樹、梶田真道、金山直樹、大森斉、
DT40-SWを用いるin vitro抗体作製システム
の高機能化：遺伝子変換と点突然変異の転換
システムの構築、第61回日本生物工学会大
会、2009.9.24 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曲 正樹 (MAGARI MASAKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：50359882

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携代表者

該当なし