

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360343

研究課題名(和文) 変異能力を有した培養 B 細胞株の機能拡張と抗体工学的活用

研究課題名(英文) Antibody engineering in a hypermutating B cell line

研究代表者

金山 直樹 (KANAYAMA, NAOKI)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：70304334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,600,000 円

研究成果の概要(和文)：抗体は次世代の分子標的医薬として注目されており、一本鎖抗体などの改変型抗体の利用も進みつつある。我々は、これまでに変異能力を有するニワトリ B 細胞株 DT40 を利用して *in vitro* 抗体作製システムを構築した。本研究では、他の抗体作製技術で取得された任意のモノクローナル抗体の変異部や一本鎖抗体を、ヒト IgG1 抗体定常部とのキメラ抗体として DT40 細胞表面に発現させることができ、かつ、DT40 の変異能力によって親和性成熟できる革新的な動物細胞ディスプレイシステムを構築した。本研究の成果は、医薬候補となりうる活性を有した抗体を創出するための技術として有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Antibody is being applied for a next generation molecular targeting drug, and modified versions of antibodies, such as single chain antibodies, are also being developed. We have established an *in vitro* antibody generation system using a hypermutating chicken B cell line, DT40. In this study, we established a novel animal display system, in which any antibody or antibody variant of interest, even though it is derived from the other technology, can be introduced and expressed as a chimeric antibody with the human IgG1 constant region on DT40 cells, and then can be improved in its affinity with the mutation machinery of DT40 cells. This study will be useful for creating antibodies that have valuable activities as antibody drugs.

研究分野：細胞工学

キーワード：抗体 体細胞高頻度突然変異 DT40 親和性成熟 タンパク質ディスプレー

### 1. 研究開始当初の背景

標的に特異的に結合する抗体は、抗体医薬と呼ばれる副作用の低い次世代の分子標的治療薬として活用されてきている。近年では、通常型の抗体のみならず、重鎖と軽鎖の可変部を連結した一本鎖 Fv 抗体、重鎖可変部のみからなる単ドメイン抗体などが注目されている。これらは、通常型の抗体が結合できない小さく狭い標的部位への結合や、一本鎖であることによる生産性の向上が期待されており、次世代型の抗体医薬として期待されている。抗体の医薬への活用において、高親和性の抗体を高効率に単離したり、取得抗体に変異導入して親和性を向上させたりする(親和性成熟)の技術が非常に求められている。タンパク質ディスプレイ技術により抗体の機能的改変は試みられているが、導入する変異のほとんどが標的タンパク質を失活させるため有用な活性を有する変異抗体を含むライブラリーの作製は非常に大きな課題となっている。

我々は、抗体遺伝子に高頻度突然変異を自発的に起こすニワトリ B 細胞株 DT40 に注目し、革新的な *in vitro* 抗体作製システムをこれまでに構築した (BBRC 327:70, 2005; J. Biosci. Bioeng. 102:178, 2006)。この方法は、生体内での抗体産生系を *in vitro* 培養系を用いて再現することにより、従来の抗体作製方法では取得が困難であった自己反応性の抗体の作製を可能にし、また、抗体遺伝子への変異導入と高親和性クローンの選択を繰り返すことにより、取得した抗体の簡便な親和性成熟を可能にした (J. Biosci. Bioeng. 110:351, 2010)。さらに、DT40 において外来遺伝子の改変が可能であることを見だし (Nucleic Acid Res. 34:e10, 2006) 任意の抗体遺伝子を DT40 のゲノム上の抗体可変部遺伝子に挿入することにより機能改良する技術を開発した。IgM 抗体を産生する DT40 の抗体定常部遺伝子を、DT40 の変異能力を失わせることなく異種生物由来の抗体定常部遺伝子に置換し、キメラ抗体を発現させることにも成功している。

上記の研究成果から、通常型や一本鎖型などの形態に関わらず任意の抗体可変部を、抗体としてより有用なヒト IgG1 定常部とのキメラ抗体として DT40 細胞表面に発現させ、DT40 の変異能力によって改変できる系を構築可能であるとの着想に至った。抗体産生は、抗体産生細胞内のタンパク質品質管理機構によって制御されている。すなわち、親和性成熟させたい抗体への変異導入とその変異体の発現に、DT40 のような自律的変異導入能力を有する抗体産生細胞株を活用することにより、有用な活性を備えた変異抗体を含む抗体ライブラリーを効率よく作製可能であると考えられる。さらに、DT40 は相同組換え効率が動物細胞株では例外的に高く、上記のような細胞の分子育種に非常に適している。

### 2. 研究の目的

抗体は次世代の分子標的医薬として注目されており、一本鎖抗体などの改変型抗体の利用も進みつつある。我々は、これまでに変異能力を有するニワトリ B 細胞株 DT40 を利用して *in vitro* 抗体作製システムを構築した。本研究では、他の抗体作製技術で取得された任意のモノクローナル抗体の可変部や一本鎖抗体を、ヒト IgG1 抗体定常部とのキメラ抗体として DT40 細胞表面に発現させることができ、かつ、DT40 の変異能力によって親和性成熟できる革新的な動物細胞ディスプレイシステムを構築する。さらに、構造的に安定な変異抗体を発現する細胞の濃縮方法や、効率的な高親和性抗体産生細胞の選択方法を確立して、有用な活性を有した抗体創出の効率化を図る。

### 3. 研究の方法

DT40 は、抗体を細胞表面に提示かつ細胞外に分泌し、培養のみで抗体遺伝子に変異を導入する。また、高頻度の相同組換えによって遺伝子改変が容易である。我々は、これらの性質を利用して変異能力を ON/OFF できる細胞株 DT40-SW を樹立し (BBRC 327:70, 2005)、抗体作製システムに用いてきた。本研究では、DT40-SW を改変して任意の抗体可変部を効率よく親和性成熟させる基盤技術を確立するため、以下の研究項目を検討した。

ヒト抗体定常部を発現する DT40 の樹立  
(a) 任意のモノクローナル抗体の可変部 VH/VL 遺伝子を、DT40 の抗体可変部遺伝子と置換してニワトリ IgM 抗体とのキメラ抗体として発現させ、DT40 の変異能力によって改変する方法はこれまでに開発済みである。医薬への抗体の利用には、生体内でのエフェクター機能の高い IgG1 アイソタイプであることが必須であり、IgG1 抗体は IgM 抗体より精製が容易である点や安定性が高いという利点もある。本項目では、DT40 の IgM 抗体定常部遺伝子をヒト IgG1 抗体定常部遺伝子に、軽鎖定常部遺伝子をヒト 軽鎖定常部遺伝子に相同組換えにより置換した細胞を樹立した。細胞表面型抗体と分泌型抗体の両方を発現することは、目的抗体産生細胞の単離と抗体評価に重要であることから、細胞表面型と分泌型抗体のそれぞれの C 末端をコードするエキソンの alternative splicing により両アイソフォームが発現されるように相同組換えベクターを構築した。

(b) 一本鎖 Fv 抗体や単ドメイン抗体を抗体定常部 Fc とのキメラ抗体として DT40-SW に発現させるために、軽鎖との会合に必要な CH1 ドメインを欠損させたヒト IgG1 抗体重鎖定常部(ヒト IgG1 Fc)遺伝子を、上記と同様の方法で DT40-SW に導入した。

#### 有用な抗体の親和性成熟方法の確立

(a) 心筋梗塞時に発生する血栓を防止する効果のある抗血小板糖タンパク質 ヒト抗体の親和性成熟を行うために、このヒト抗体

の可変部遺伝子をクローニングし、 で樹立したヒト定常部発現 DT40-SW 細胞に遺伝子導入した。その後、DT40 細胞の変異能力によって導入したヒト抗体可変部に変異を誘発し、得られた変異体ライブラリーからヒト血小板糖タンパク質への親和性の向上した抗体産生クローンを、セルソーターを用いて単離した。単離した抗体は、その遺伝子をヒト 293T 細胞において発現させ、評価した。

(b)ガン細胞表面に多く発現する内皮成長因子受容体(EGFR)に対する抗体に特異的なラマ由来単一ドメイン抗体遺伝子を、 で樹立した細胞に遺伝子導入し、(a)と同様に変異を導入してライブラリーを作製し、セルソーターを用いて EGFR に対する親和性の向上した抗体産生クローンを単離した。

#### 4. 研究成果

ヒト IgG1 抗体定常部を発現する DT40 の樹立

外来から導入した様々な形態の抗体可変部遺伝子に対して変異導入可能で、かつ、ヒト IgG1 定常部とのキメラ抗体として発現可能な DT40 細胞株を樹立した。

(a)DT40-SW の重鎖/軽鎖定常部遺伝子を相同組換えベクターを用いて置換し、ヒト IgG1 抗体定常部を発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞は、ニワトリ可変部とヒト IgG1 定常部のキメラ抗体を細胞表面上および培養上清中に発現した。また、この細胞の変異能力を ON にして培養すると、ニワトリ可変部への変異導入が可能であり、抗体ライブラリー作製の種細胞としての有用性が示された。

(b)DT40-SW の重鎖定常部遺伝子をそう相同組換えベクターを用いて置換し、ヒト IgG1 抗体定常部 Fc を発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞は、重鎖可変部がニワトリ由来のままでは、導入した抗体 Fc を発現しなかったが、重鎖可変部遺伝子を mCherry タンパク質遺伝子に置換すると、mCherry-Fc 融合タンパク質として、細胞表面上と培養上清中に発現させることに成功した。この細胞の変異能力を ON にすると、導入した mCherry 遺伝子上に変異導入が可能である、任意のタンパク質を細胞表面にディスプレイし、改変できる細胞としての可能性が示された。

有用な抗体の親和性成熟方法の確立  
実用上の有用性が想定される標的抗体の可変部遺伝子を で樹立した改変 DT40 細胞株に導入し親和性の向上した抗体の効率的作製方法を確立した。

(a) 抗血小板抗原ヒト抗体産生細胞の樹立と親和性成熟

ヒト血小板糖タンパク質に対するヒト抗体可変部を で樹立したヒト抗体定常部産生細胞に導入し、完全ヒト抗体を発現する DT40 細胞の樹立に成功した。この細胞において変異導入を ON にすると変異導入が可能であり、一定期間培養することによって変異体ライ

ブラリーを作製することに成功した。このライブラリーからヒト血小板糖タンパク質にたいする親和性の向上したクローンを、セルソーターを用いて繰り返し濃縮した所、親和性が 20 倍以上上昇した抗体産生クローンの取得に成功した。

(b) 抗ヒト EGFR ラマ由来単一ドメイン抗体発現細胞の樹立と親和性成熟

ヒト EGFR 特異的ラマ由来単一ドメイン抗体の遺伝子をニワトリのコドン使用頻度に最適化した合成遺伝子を作製し、 で作製したヒト IgG1 Fc 産生細胞に導入した。樹立した細胞は、再乏尿免疫状及び培養上清中に安定にラマ抗体可変部とヒト IgG1 Fc との融合タンパク質を発現し、この細胞の変異能力を ON にすることによって、導入した遺伝子への変異導入が可能であることが示された。一定期間、変異 ON の状態で培養することによって導入した単一ドメイン抗体の遺伝子に変異が導入された変異体ライブラリーの作製に成功した。セルソーターを用いて変異体ライブラリーから EGFR に対して親和性の向上した変異体抗体の取得を試みたところ、2 倍程度、親和性の向上した抗体産生クローンの単離に成功した。

上記の結果は、本研究で樹立した細胞株が各種有用抗体の機能向上のためのプラットフォームとして有用であることを示している。今後、取得した抗体の実用性を評価したり、別の医薬シーズとなる抗体の向上に本研究を活用したりすることによって、有用な抗体医薬の開発に利用可能な実用技術として実証することができると思われる。

#### 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 7 件)

(1) Yamane, F., Kanayama, N., Magari, M., et al., CSF-1 receptor-mediated differentiation of a new type of monocytic cell with B cell-stimulating activity: its selective dependence on IL-34, *Journal of Leukocyte Biology* (査読あり), Vol. 95, 19-31, 2014, DOI: 10.1189/jlb.0613311

(2) 曲 正樹、金山直樹、免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異と serine/arginine protein splicing factor (SRSF)、*臨床免疫・アレルギー科* (査読無し)、Vol. 61 (5)、489-495、2014

(3) 金山直樹、曲 正樹、AID による免疫グロブリンの体細胞高頻度突然変異誘導と関連分子、*臨床免疫・アレルギー科* (査読無し)、Vol. 61 (5)、467-471、2014

(4) 金山直樹、フローサイトメトリー～「前にならえ」並べて順に数えます～、*生物工学会誌* (査読無し)、Vol. 90 (11)、785-789、2012

- (5) 金山直樹、大森 斉、抗体遺伝子への突然変異能を有するニワトリ B 細胞株の機能拡張による in vitro モノクローナル抗体作製・改良システム、細胞工学(査読無し)、Vol. 31 (10)、1169-1165、2012
- (6) 曲 正樹、金山直樹、大森 斉、胚中心における B 細胞の negative selection と濾胞樹状細胞、臨床免疫・アレルギー科(査読無し)、Vol. 58 (3)、259-265、2012
- (7) Yurimoto, S., Magari, M., Kanayama, N., et al., In vitro substrate phosphorylation by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase using guanosine-5'-triphosphate as a phosphate donor *Bmc Biochemistry* (査読あり), Vol. 13, 2012, DOI: 10.1186/1471-2091-13-27

〔学会発表〕(計 33 件)

- (1)古賀 舞、金山直樹、曲 正樹ら  
抗原レセプターシグナル依存性アポトーシス因子を抑制したニワトリ B 細胞株を用いた高親和性抗体の作製  
第 37 回日本分子生物学会年会  
2014.11.27 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- (2)金山直樹ら  
変異能力を備えた B 細胞株を用いた抗体の機能変化  
第 66 回日本生物工学会大会  
2014.9.1 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
- (3)川上 夏奈江、金山直樹、曲 正樹ら  
ヒト抗体産生型ニワトリ B 細胞株を用いた異種抗体改良システムによる抗血小板ヒトモノクローナル抗体の親和性成熟  
第 36 回日本分子生物学会年会  
2013.12.4 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
- (4)植月 英智、金山直樹、曲 正樹ら  
変異能力を内包する新規な動物細胞ディスプレイシステムによる単一ドメイン抗体の親和性成熟  
第 36 回日本分子生物学会年会  
2013.12.4 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)
- (5)古賀 舞、金山直樹、曲 正樹ら  
B 細胞抗原レセプター依存性アポトーシスの制御によるニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いた高親和性抗体の作製  
第 65 回 日本生物工学会大会  
2013.9.20 広島国際会議場(広島県・広島市)
- (6)渡邊 康二、金山直樹、曲 正樹ら  
変異能力を有する B 細胞株 DT40-SW を用いたタンパク質ディスプレイシステムにおけるタンパク質進化  
第 65 回 日本生物工学会大会  
2013.9.20 広島国際会議場(広島県・広島市)
- (7)金山直樹ら  
抗体遺伝子への突然変異能を有するニワト

リ B 細胞株の抗体工学的応用による抗体機能変化

- 第 35 回 日本分子生物学会 年会  
2012.12.14 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)
- (8)渡邊 康二、金山直樹、曲 正樹ら  
DT40 細胞株を用いた in vitro 抗体作製システムにおける、抗原レセプターの刺激に依存した生存による抗原特異的抗体産生細胞の選択法の開発  
第 35 回 日本分子生物学会 年会  
2012.12.14 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)
- (9)川上夏奈江、金山直樹、曲 正樹ら  
ヒト型抗体産生ニワトリ B 細胞株 DT40 を用いた抗原特異的抗体の作製  
第 64 回 日本生物工学会大会  
2012.10.26 神戸国際会議場(兵庫県・神戸)
- (10)日笠卓哉、金山直樹、曲 正樹ら  
変異能力を有する培養 B 細胞株 DT40 を用いた新規なタンパク質ディスプレイシステムの開発  
第 64 回 日本生物工学会大会  
2012.10.26 神戸国際会議場(兵庫県・神戸)
- (11)佐井燕、金山直樹、曲 正樹ら  
ニワトリ B 細胞株 DT40-SW を用いた異種抗体改良システムの構築  
第 64 回 日本生物工学会大会  
2012.10.26 神戸国際会議場(兵庫県・神戸)

〔図書〕(計 2 件)

- (1) 金山直樹、他、化学同人、ひらく、ひらく「バイオの世界」14 才からの生物工学入門  
日本生物工学会編、2012、24-25、108-109
- (2) 金山直樹、他、シーエムシー出版、次世代抗体医薬開発に向けた抗体工学の最前線、2012、220-226

## 6. 研究組織

- (1)研究代表者  
金山 直樹 (KANAYAMA NAOKI)  
岡山大学・大学院自然科学研究科・准教授  
研究者番号： 70304334
- (3)連携研究者  
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