

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560430

研究課題名(和文) 二重特異性抗体を迅速に作製する in vitro 技術開発

研究課題名(英文) Development of the technology to rapidly generate bispecific antibodies.

## 研究代表者

瀬尾 秀宗 (SEO, Hidetaka)

東京大学・総合文化研究科・研究員

研究者番号：00561531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まずニワトリDT40抗体遺伝子における相同組換え頻度を、従来法と比較して遥かに簡便にモニタリングする技術を実現した。次に、本技術を利用して二重特異性抗体を創出しうる形で相同組換えを起こさせることに成功したのに加え、それがTSA(相同組換え頻度を亢進させる薬剤)処理により亢進できることも確認し、二重特異性抗体用ライブラリ作製のための基礎技術を確立した。本研究では相同組換え活性を適宜制御する技術開発も行ったが、そのために必要な遺伝子領域の単離及び制御用ベクターの開発を実施した。以上より、研究期間全体を通し、二重特異性抗体ライブラリを作製する上で必須な要素技術が開発できたとと言える。

研究成果の概要(英文)：The system more convenient than the conventional one was developed to monitor homologous recombination events at immunoglobulin locus of DT40 cell, a chicken derived cell line. By using this system, the technology was successfully developed to induce homologous recombination at immunoglobulin locus so that the diversity can be generated suitable for the preparation of bispecific antibody libraries. The frequency of this homologous recombination was shown to be enhanced by TSA (a drug that accelerate homologous recombination rate) treatment, which suggests that the basic technology to prepare library to generate bispecific antibodies was developed. To develop the technology to switch the homologous recombination activities, the related chicken genomic region was cloned and the vector was constructed to control the homologous recombination activity. Taken together, the component technologies necessary for the development of bispecific antibody libraries were successfully developed.

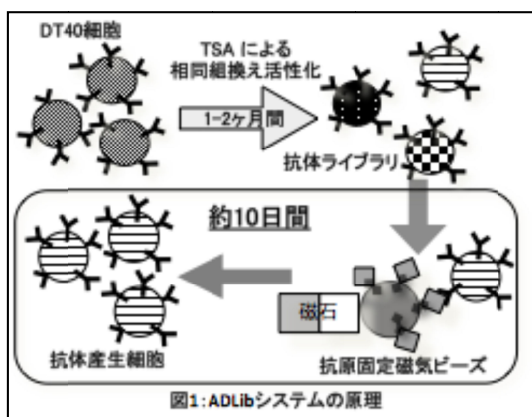
研究分野：抗体工学

キーワード：抗体 相同組換え 遺伝子変換 二重特異性抗体

## 1. 研究開始当初の背景

筆者らは、抗体作製期間が約 10 日間と超迅速な試験管内モノクローナル抗体作製新規技術(ADLib システム)の開発を行ってきた。本技術は迅速である事に加え、従来法より幅広い抗原に適用可能な画期的技術である (Seo et al. *Nat Biotech.* 2005)。

ADLib システムの原理は以下の通りである。ニワトリ抗体遺伝子は相同組換えにより多様化しているが、筆者らはニワトリ免疫細胞である DT40 細胞をトリコスタチン A (TSA:ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤)で処理する事で、この相同組換えが亢進する事を見いだした。ADLib システムでは、本現象を利用して得た抗体提示細胞ライブラリから磁気ビーズ等を利用して抗原特異的細胞を単離する(図1)。



一方、抗体はその高い薬効と安全性でバイオ医薬品の主流となっており、様々な抗体医薬品が開発されている。しかしながら抗原の候補は出尽くしつつあり、単一抗原に対する新規の抗体医薬開発が困難になってきている。こうした状況の打開策の一つとして二重特異性抗体が注目されており、例えば癌細胞を免

疫細胞と会合させ癌細胞を殺傷する抗体医薬が、既に上市されている。しかしながら二重特異性抗体開発は従来型抗体二種を培養細胞で共発現して作製するため、スクリーニング、発現、精製プロセスで膨大な労力を要する。

ADLib システムは迅速かつ柔軟性のある技術であり、抗体医薬開発は最もその適用効果が期待できる分野の一つと言えるが、現時点では直接二重特異性抗体を取得することはできない。このため ADLib システムの長所を生かしつつ、簡便に二重特異性抗体の取得できる技術を実現できれば、次世代抗体医薬品の開発を大幅に加速できることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、ADLib システムを改良し、二重特異性抗体を簡便かつ迅速に取得可能な技術を開発することを目的とする。そのために下記の要素技術開発及び検討を実施する。

### (1) 相同組換えの簡便なモニタリング法の開発

抗体遺伝子における相同組換え頻度を測定する方法としては、現在 reversion assay と呼ばれる実験を行うのが一般的である。これは、相同組換えにより抗体遺伝子可変領域にフレームシフト変異が導入され、抗体を提示しなくなった DT40 細胞を利用する。この細胞を培養し、相同組換えにより再びフレームシフトが修復されて抗体を提示するようになった細胞の割合を FACS で測定することで遺伝子変換頻度を計測する。本手法では細胞を抗体染色する必要があるため、多数の細胞について検討するのは労力がかかる。このため、

より簡便に相同組換え頻度測定可能な系を開発する。

#### (2) 二重特異性抗体を創出しうる形で抗体遺伝子を多様化させる技術の開発

一般に、1つのB細胞は1種の抗原を認識する抗体を産生するよう制御されている。このため野生型 DT40 の抗体遺伝子は、1種の抗原を認識する抗体を取得すべく多様化するのに最適化されている。これを、2種の抗原に対する抗体を創出しうるよう遺伝子レベルで改変する。

#### (3) 相同組換え活性の制御技術開発

前述のように、抗体遺伝子座で起きている相同組換えは TSA 処理により亢進する。2) で述べた抗体遺伝子の改変を行った後は、TSA により多様化を促進するだけでなく、状況に応じて TSA を添加しても抗体遺伝子が多様化しないように制御する必要があるため、その制御技術を開発する。

#### (4) 二重特異性抗体単離に向けたライブラリ作製法及びセクション方法に関する検討

二重特異性抗体を創出するためのライブラリ多様化手法や、磁気ビーズセクション法の開発に向けた検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 相同組換えの簡便なモニタリング法の開発

レポーターを活用し、フレームシフト変異が修復された際にレポーターが作動するようにする。これにより、抗体染色を行わずに相同組換え頻度のモニタリングが可能となる。

#### (2) 二重特異性抗体を創出しうる形で抗体

#### 遺伝子を多様化させる技術の開発

DT40 はノックイン、ノックアウトといったジーンターゲティングが容易な細胞である。このことを生かし、DT40 ゲノムの抗体遺伝子座を、二重特異性抗体を創出しうる形に改変する。

#### (3) 相同組換え活性の制御技術開発

ニワトリ細胞では、抗体遺伝子座における相同組換えが起きているのはB細胞に限定される。すなわち相同組換えを抑えるための機構も存在する。この機構を、人為的に制御しうる形で DT40 に導入し、相同組換え活性を自在にコントロールできるようにする。

#### (4) 二重特異性抗体単離に向けたライブラリ作製法及びセクション方法に関する検討

2)、3) で開発した細胞を用い、TSA による多様化の試験を実施する。また二段階の磁気ビーズセクションにより、二重特異性抗体の取得を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) 相同組換えの簡便なモニタリング法の開発

相同組換えによりフレームシフトが修復されることでレポーターが作動することが確認された。また TSA 依存的に相同組換え頻度が亢進することも確認され、従来の抗体染色による手法よりもはるかに簡便な相同組換えモニタリング法が確立できた。

#### (2) 二重特異性抗体を創出しうる形で抗体遺伝子を多様化させる技術の開発

抗体遺伝子を改変し、2種の抗原を同時に認識する抗体を創出しうる形で抗体遺伝子を

多様化させることに成功した。多様化の頻度は野生型の DT40 と遜色がないことが確認された。

### (3) 相同組換え活性の制御技術開発

相同組換えを抑制する機構を導入するために必要な遺伝子配列のクローニング及び、ノックインベクター作製を完了させた。

### (4) 二重特異性抗体単離に向けたライブラリ作製法及びセレクション方法に関する検討

2) で得られた株を TSA 処理し、二重特異性抗体を創出しうる形で相同組換えを亢進させることに成功した。これにより、二重特異性抗体用ライブラリ作製のための基礎的な知見が得られた。

#### < 引用文献 >

Seo H, Masuoka M, Murofushi H, Takeda S, Shibata T and Ohta K (2005) Rapid generation of specific antibodies by enhanced homologous recombination. *Nat. Biotechnol.* **23**: 731-5

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 橋本講司、黒澤恒平、村山晃歩、瀬尾秀宗、太田邦史：免疫細胞を利用した抗体エンジニアリング技術の開発 第 16 回東京大学生命科学シンポジウム 2016.4.23-4.23 (東京大学・東京都目黒区、発表確定)

2. Akiho Murayama, Hidetaka Seo and Kunihiro Ohta: Artificial evolution of

variable domains of antibody genes in chicken DT40 cells. Q-Bio 2016 Winter 2016.2.14-2.18 (ハワイ州・アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

瀬尾 秀宗 (SEO, Hideteaka)

東京大学・総合文化研究科・特任研究員

研究者番号：00561531