

学位論文の要旨

専攻名	材料科学 専攻	ふりがな 氏名	いそぎき ゆうし 磯崎 勇志 ㊟
学位論文題目 レセプター特異的立体構造認識モノクローナル抗体作製技術の創製とその医工応用 (英訳又 Development in an original technology for selective production of stereospecific monoclonal antibodies against the native receptor and its application to medical engineering)			
<p>本研究は、ハイブリドーマテクノロジー「立体構造特異的ターゲティング (Stereospecific targeting ; SST) 法」に基づき、Gタンパク質共役受容体 (GPCR) の1つであるヒト副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体 (huCRHR1) に対する立体構造特異的モノクローナル抗体 (ssmAb) の効率的作製技術の創製とその医工応用を目的とした。生体内で機能するすべてのタンパク質 (抗原) は、それぞれ独自の立体構造を有していることから、その立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製は極めて重要である。しかし、現在、多くのモノクローナル抗体は目的抗原の一次配列を認識しており、ssmAbの作製は困難である。そこで、SST法に基づき、目的抗原のssmAbの作製を目ざした。作製されたモノクローナル抗体を様々な方法で解析することで、目的抗原の立体構造の特異的認識を評価した。</p> <p>SST法は3つの重要ステップで構成されている。1) DNA免疫法および細胞免疫法によるssmAb産生B細胞の免疫化、2) 抗原発現ミエローマ細胞に基づく、B細胞受容体を介した感作B細胞の選択、3) 電気パルスを利用したB細胞-ミエローマ細胞複合体の選択融合による、効率的ハイブリドーマの作製である。</p> <p>まず初めに、SST法に必要なhuCRHR1発現組換えミエローマ細胞と、ssmAbの評価に使用するhuCRHR1発現組換えCHO-K1細胞を作製した。どちらの細胞においても、huCRHR1は高次構造を保持したインタクトな状態で膜表面に発現される。</p> <p>SST法を用いて融合実験を行った結果、多くの目的の抗体産生ハイブリドーマを作製することができた。インタクトなhuCRHR1への抗体の結合を定量できるCell-ELISA法を利用して解析したところ、陽性率 (目的の抗体産生ハイブリドーマウェル数 / 全ハイブリドーマ陽性ウェル数) が28.6%以上と比較的高く、SST法は有用なssmAb作製法の可能性が示唆された。最終的に3種類の精製ssmAb (C7-E3、C7-G1、C7-H6) の作製に成功した。さらに、ELISA法を用いてサブクラスがIgG2aタイプであることを決定した。</p> <p>次に、huCRHR1発現CHO-K1細胞を用いて精製ssmAbの様々な解析を行った。免疫蛍光染色法では、精製ssmAbが細胞表面上に結合していることが確認できた。一方、huCRHR1発現CHO-K1細胞を変性させたウェスタンブロッティング法においては、精製ssmAbとhuCRHR1との特異的な結合は認められなかった。また、4%パラホルムアルデヒドによって細胞表面上のタンパク質を部分変性した場合も、huCRHR1発現CHO-K1細胞に対する精製ssmAbの結合が低下することが、免疫蛍光染色法およびフローサイトメトリー解析によって実証された。</p>			

ふりがな 氏名	いそざき ゆうし 磯崎 勇志 ㊞
------------	---------------------

これらのことから、精製 ssmAb は huCRHR1 の本来の高次構造を認識しており、変性または部分変性された huCRHR1 に対する親和性の低下が示された。

一方、huCRHR1 を昆虫細胞 Sf9 上に発現させた場合、クローン化ハイブリドーマ C7-E3 から得られた精製 ssmAb のみにわずかな結合が認められたが、他の 2 種類の C7-G1、C7-H6 由来の精製 ssmAb では、結合は確認されなかった。この結果は、昆虫細胞とほ乳類細胞 (CHO-K1 細胞) において、抗原に付加される糖鎖構造のわずかな違いが重要である可能性を示唆している。さらに、精製 ssmAb のリガンド分子 (CRH) との競合アッセイを行った結果、CRH の添加量が増すにつれて、わずかではあるが、精製 ssmAb の細胞膜上のインタクト huCRHR1 への結合量が増加した。これによって、精製 ssmAb の認識部位と CRH の認識部位は異なる結果が示された。

次に、SST 法において重要なステップの 1 つである DNA 免疫法に着目して、高特異性・高親和性 ssmAb を取得するための条件を検討した。その結果、DNA 免疫 4 回、細胞免疫 1 回、免疫期間 3~4 ヶ月の条件において、特異性および親和性が高い IgG タイプの ssmAb を選択的に作製できる可能性を見出した。

本研究では、立体構造特異的モノクローナル抗体の作製技術の創製をめざし、ハイブリドーマテクノロジーに基づき世界初の試みを行った。本研究の成果は、世界の分子標的治療薬 (抗体医薬) に対する考え方を根本的に変える可能性がある。その理由は、立体構造特異的モノクローナル抗体は、従来の一次配列認識のモノクローナル抗体に比べて、生体内で本来の高次構造を保持している標的抗原に対して、より特異的かつ高い親和性で認識および結合できると予測されるからである。本法は次世代の分子標的治療薬としての革新的な抗体作製技術を提供すると期待できる。