

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

令和4年3月

三重大学 大学院工学研究科 博士後期課程

材料科学専攻 分子生物工学研究室

磯崎 勇志

目次

第1章 序論

1.1	モノクローナル抗体について	1
1.2	モノクローナル抗体作製法の歴史	4
1.3	近年のモノクローナル抗体の利用例	7
1.4	立体構造特異的ターゲティング (SST) 法	11
1.5	CRHR1 について	14
1.6	本研究の目的	17
1.7	本論文の構成	18

第2章 立体構造認識モノクローナル抗体の作製

2.1	目的	19
2.2	材料および方法	20
2.3	結果および考察	
2.3.1	Human CRHR1 発現組換え細胞の作製	28
2.3.2	立体構造特異的ターゲティング (SST) 法に基づくモノクローナル抗体の作製	36
2.4	まとめ	43

第3章 立体構造認識モノクローナル抗体の評価

3.1 目的	44
3.2 材料および方法	45
3.3 結果および考察	
3.3.1 立体構造特異的モノクローナル抗体の精製	54
3.3.2 精製モノクローナル抗体の特徴	57
3.3.3 免疫蛍光染色法に基づく精製モノクローナル抗体の評価	61
3.3.4 バキュロウイルスを用いた精製モノクローナル抗体の評価	65
3.3.5 huCRHR1 のリガンド分子 CRH との競合アッセイ	68
3.4 まとめ	70

第4章 立体構造特異的ターゲティング (SST) 法における IgG モノクローナル抗体の効率的取得

4.1 目的	72
4.2 材料と方法	73
4.3 結果及び考察	
4.3.1 DNA 免疫回数の違いによるマウス血清抗体価およびアイソタイプ の変化	77
4.3.2 SST 法に基づく DNA 免疫回数の違いによるハイブリドーマ上清中 の抗体価およびアイソタイプの決定	80

4.3.3	立体構造認識モノクローナル抗体のクラススイッチ	84
4.4	まとめ	86
第5章 立体構造特異的モノクローナル抗体の結合部位		
5.1	目的	87
5.2	結果および考察	
5.2.1	アミノ酸配列からの考察	88
5.2.2	BepiPred-2.0 ツールを用いたエピトープ (抗原決定基) の予測	92
5.2.3	huCRHR1 の 3D 構造からのエピトープ予測	95
5.3	まとめ	97
第6章 総括		98
第7章 謝辞		102
第8章 参考文献		103
第9章 本研究における論文および学会発表リスト		116
9.1	学位論文	116
9.2	参考論文	116
9.3	総説	117

9.4	英語本	117
9.5	その他	117
9.6	学会賞	117
9.7	トピック集	118
9.8	学会発表	118

略語一覽

ACE2 ; Angiotensin converting enzyme II

APC ; Antigen presenting cell

Amp^R ; Ampicillin-resistant

BCR ; B-cell receptor (= antibody)

BCT ; B cell targeting

BPV ; Bovine papillomavirus

cAMP ; Cyclic adenosine monophosphate

CDR ; Complementarity determining region

Cell-ELISA ; Cell-based enzyme-linked immunosorbent assay

CHO ; Chinese hamster ovary

CMV-P ; Cytomegalovirus promoter

CREB ; cAMP response element binding protein

CRH ; Corticotropin-releasing hormone

CRHR1 ; Corticotropin-releasing hormone receptor 1

DMEM ; Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA ; Deoxyribonucleic acid

ELISA ; Enzyme-linked immunosorbent assay

EphA2 ; Ephrin type-A receptor 2

FCS ; Foetal calf serum

Fab ; Fragment, antigen binding

Fc ; Fragment, crystallizable

GFP ; Green fluorescent protein

GPCR ; G protein-coupled receptor

G418 ; Geneticin (= neomycin)

HAT ; Hypoxanthine, Aminopterin, Thymidine

HEPES ; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HER ; Human epidermal growth factor receptor

HRP ; Horseradish peroxidase

HT ; Hypoxanthine, Thymidine

HVJ ; Hemagglutinating Virus of Japan

IgG ; Immunoglobulin G

IgM ; Immunoglobulin M

mAb ; Monoclonal antibody

MHC ; Major histocompatibility complex

NHS ; *N*-hydroxycinnamic

Neo^R ; Neomycin-resistant

PBS ; Phosphate-buffered saline (pH = 7.2)

PD-1 ; Programmed death receptor-1

PD-L1 ; Programmed death receptor-ligand 1

PEF ; Pulsed electric field

PEG ; Polyethylene glycol

PKA ; Protein kinase A

PVDF ; Polyvinylidene difluoride

RFP ; Red fluorescent protein

RPMI1640 ; Roswell Park Memorial Institute 1640

SDS-PAGE ; Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

Sf9 ; *Spodoptera frugiperda* 9

ssmAb ; Stereospecific monoclonal antibody

SST ; Stereospecific targeting

TCR ; T cell receptor

Wb ; Western blotting

第1章 序論

1.1 モノクローナル抗体について

モノクローナル抗体は高い特異性と親和性から、診断薬や検査薬、研究用ツールなど、幅広い分野で応用されている。特に、近年、分子標的治療薬 (抗体医薬) として注目されており、現在まで、80 以上の抗体医薬が FDA で承認を受けている [1]。

モノクローナル抗体の基本構造は 2 本ずつの重鎖および軽鎖のポリペプチド鎖からなる、約 150 kDa のタンパク質である (図 1-1-1) [2]。

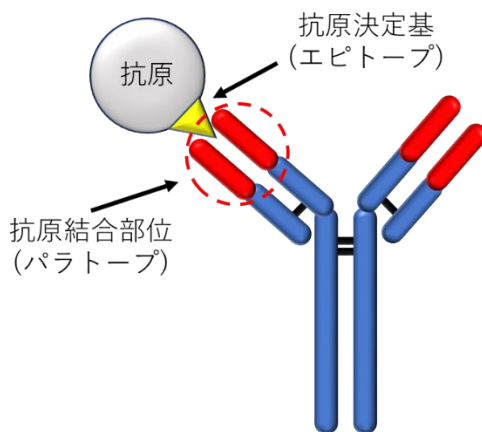


図 1-1-1 抗体の構造および抗原との結合部位

抗体には、抗原決定基 (エピトープ) と特異的に結合する抗原結合部位 (パラトープ) がある。エピトープは抗原に存在する抗体と結合する最小のアミノ酸配列であり、一つの抗原には複数のエピトープが存在する。パラトープは抗体が抗原と結合する部位で、6 個の相補性決定領域 (CDR) を含んでいる。抗体は、Fab 領域と Fc 領域の 2 つの領域に分けることができ、Fab 領域内には抗原結合部位が存在する (図 1-1-2)。

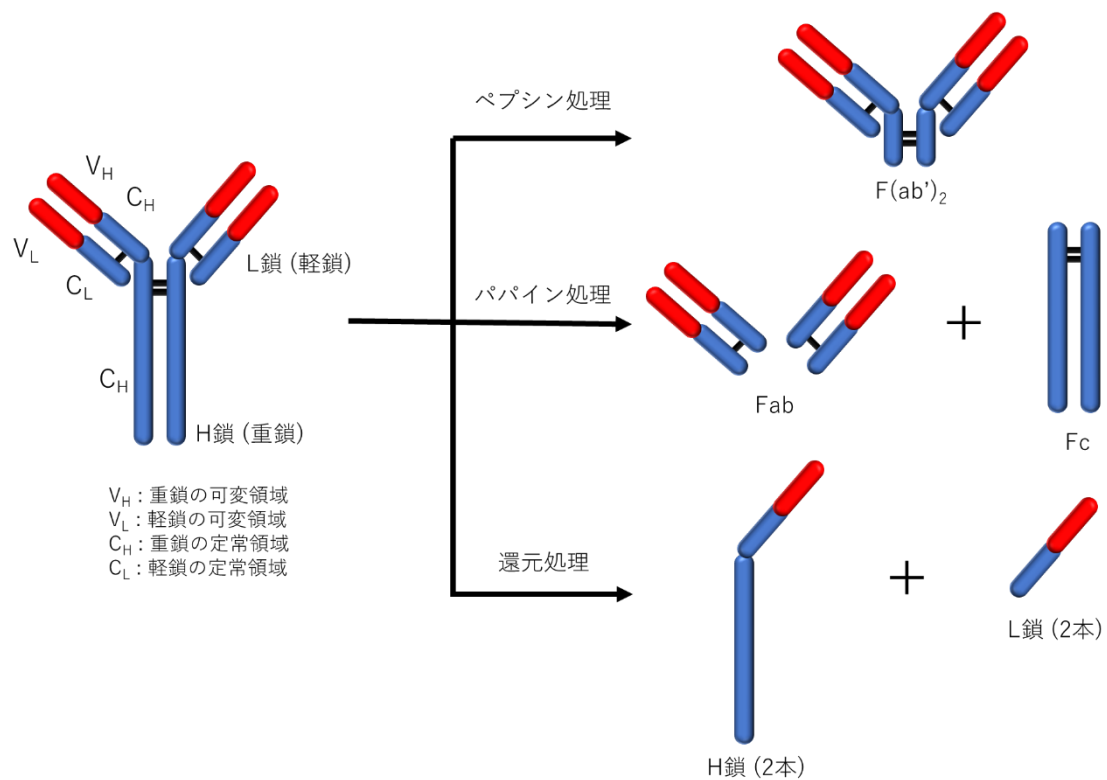


図 1-1-2 抗体部位の名称

抗体の可変領域中に存在する CDR は、3 つの CDR (CDR1、CDR2、CDR3) が存在し、超可変領域とも呼ばれる。CDR のアミノ酸配列が変化することにより、多種多様な抗原エピトープに特異的に結合することができる (図 1-1-3)。抗原エピトープと抗体パラトープは水素結合や疎水性相互作用、ファンデルワールス力、イオン相互作用などの複数の作用で結合する [3]。

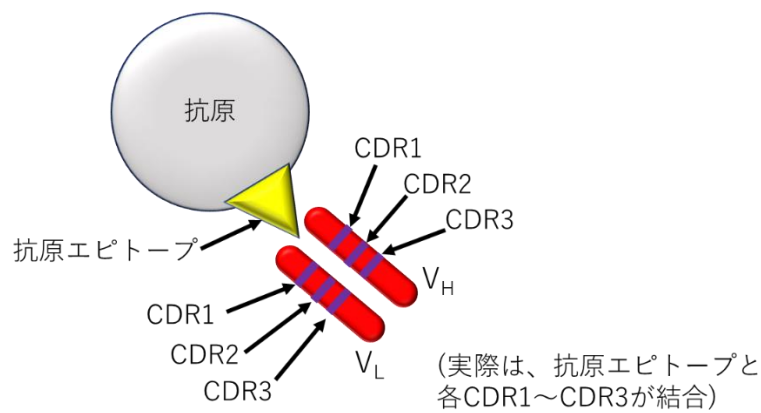


図 1-1-3 抗原エピトープと抗体可変領域の結合

抗体はB細胞によって産生され、体液性免疫において非常に重要な役割を担っている。生体内で外来からの異物 (例えばウイルス) を認識すると、免疫応答が開始される。抗原提示細胞 (APC) である樹状細胞が異物を取り込み、細胞内で分解され、その一部が 12-20 残基のペプチドとして、MHC クラス II と一緒に抗原提示され、ヘルパーT細胞が活性化される。活性化T細胞は抗原を認識したB細胞を活性化して、B細胞を形質細胞 (プラズマ細胞) に分化させることで、大量の抗体を分泌する (図 1-2)。この時、一部のB細胞はメモリーB細胞として保存され、異物の再度の侵入に備える [4]。B細胞は生体内で唯一の抗体産生細胞である。

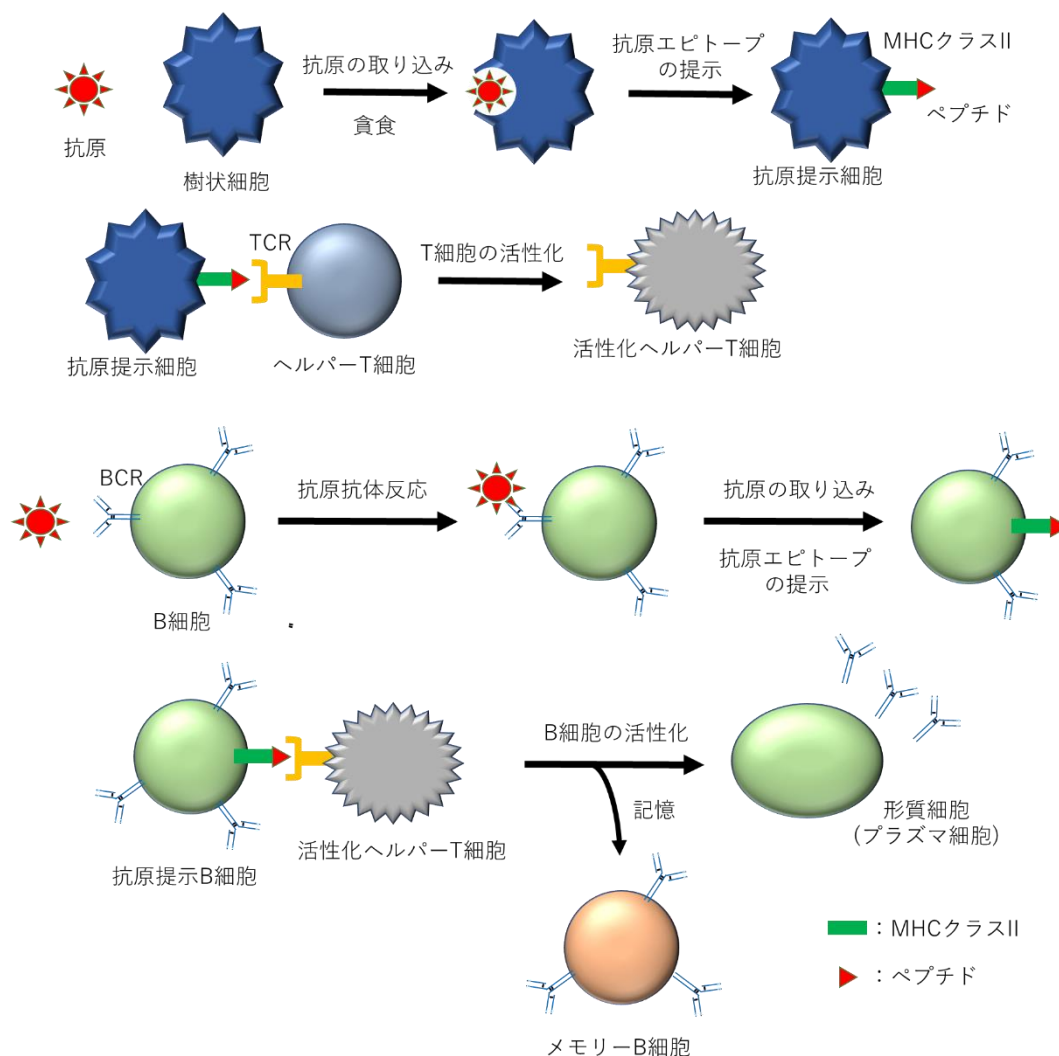


図 1-2 体液性免疫

1.2 モノクローナル抗体作製法の歴史

1975年に Köhler と Milstein によって、ヒツジ赤血球で免疫したマウスの脾細胞 (B 細胞を含む) とマウスミエローマ細胞 (骨髄種細胞) を、HVJ を用いて融合した結果、ヒツジ赤血球に対する抗体を分泌しながら無限に増殖する融合細胞 (雑種細胞 ; ハイブリドーマ) を作製することに成功した [5]。この研究を筆頭に現在までに様々なモノクローナル抗体作製法が開発された。多くのモノクローナル抗体作製技術はマウスに目的抗原を投与し、B 細胞とミエローマ細胞を融合するハイブリドーマテクノロジーに基づいている (図 1-3)。

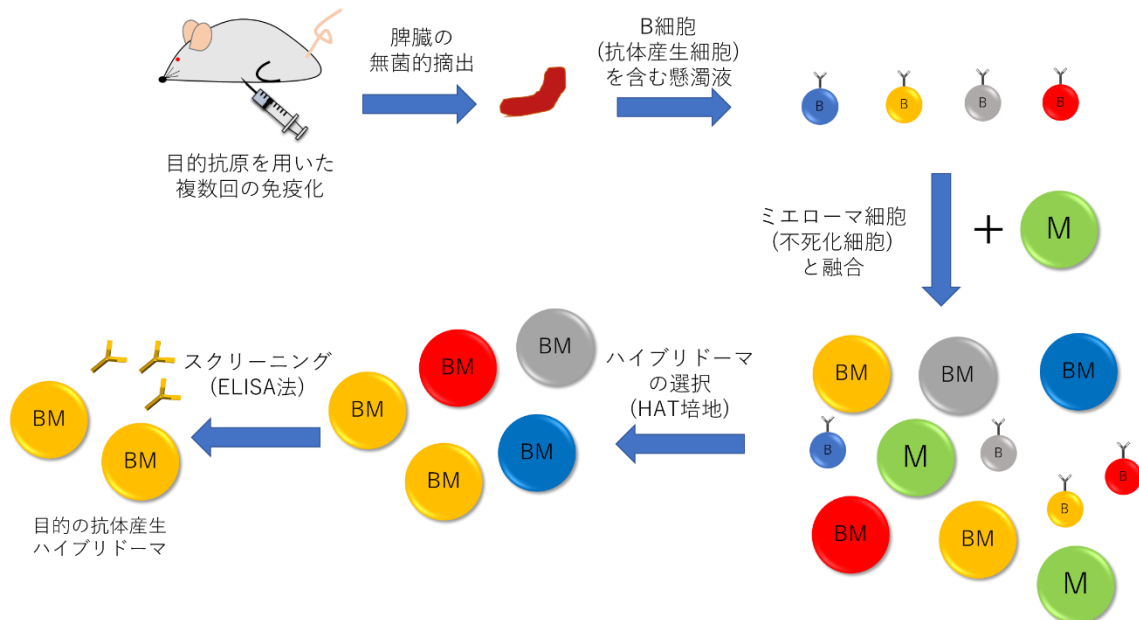


図 1-3 ハイブリドーマテクノロジー

1980年に de StGroth と Scheidegger によって開発されたポリエチレングリコール (PEG) 法 [6]、1982年に Zimmermann によって開発されたパールチェーン法 [7]、2000年には Ohkohchi *et al.* によって開発されたレーザー法 [8] などがある。いずれの融合法も非特異的融合を起こすために、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得るには、多大な費用とコストがかかる とされている (図 1-4)。

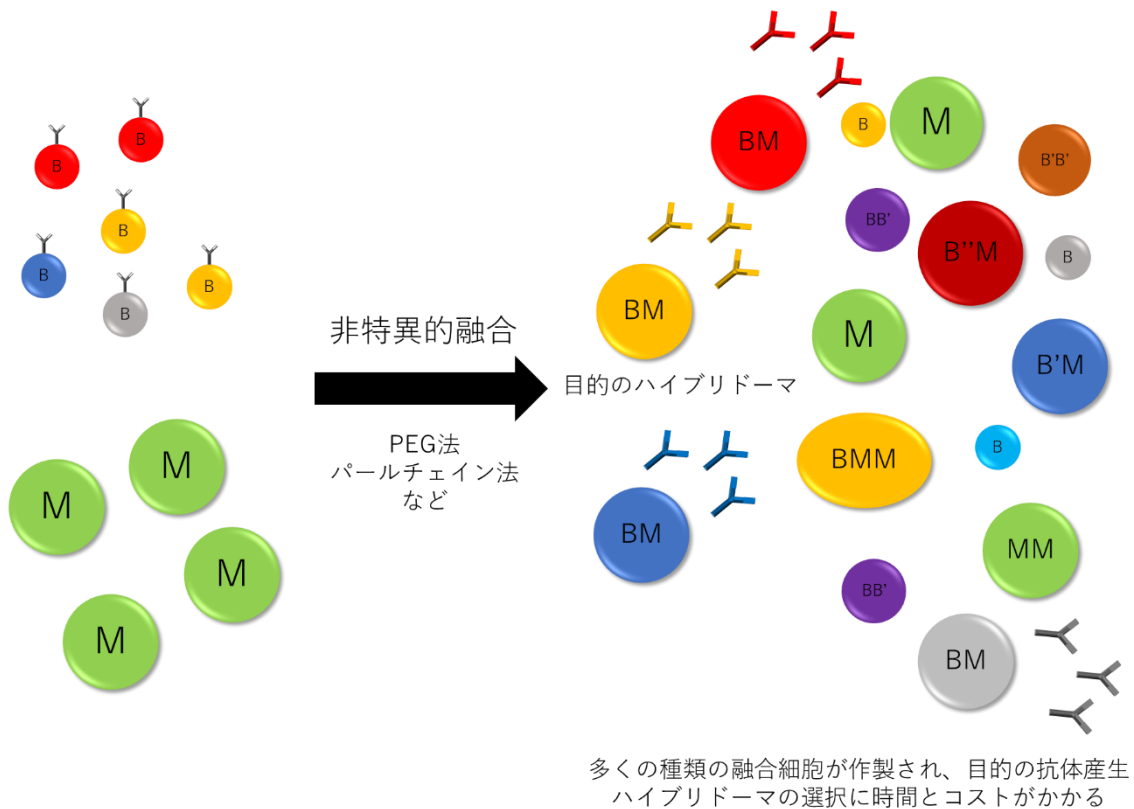


図 1-4 従来の非特異なハイブリドーマ作製技術

そこで、非特異的融合を改善するために、Lo らによって選択的電気パルス (Pulsed electric field : PEF) 法が開発された (図 1-5) [9]。

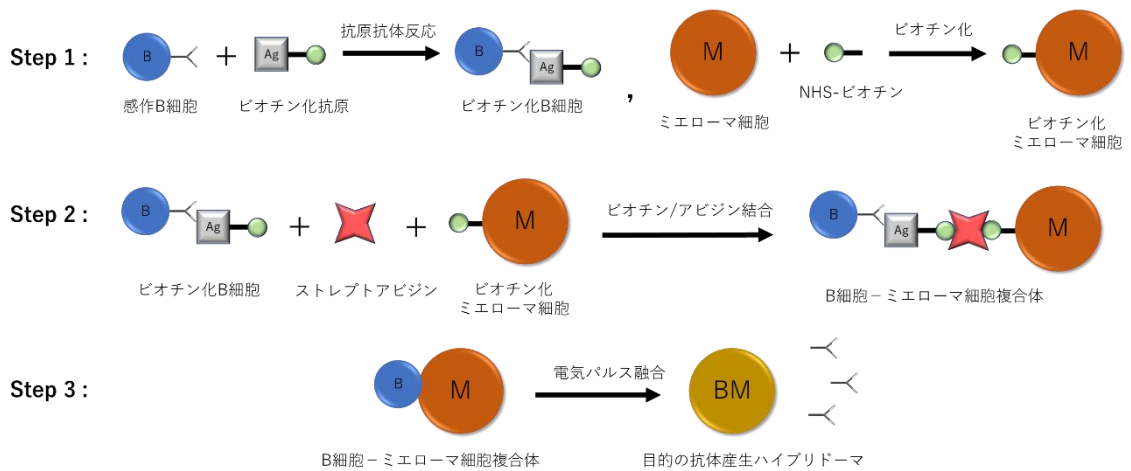


図 1-5 選択的電気パルス (PEF) 法

この方法は、目的の感作 B 細胞をビオチン化抗原を用いて抗原抗体反応に基づき予め選択し、ビオチン/アビジン間の特異的結合を利用することで、B細胞

ーミエローマ細胞複合体を形成する。この複合体を電気パルスを利用して選択的に融合し、目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを効率的に作製する技術である。電気パルス融合の特徴は、ビオチン/アビジン架橋によって膜を接している細胞のみを選択融合する。

その後、私達の研究グループは、PEF法を発展させたB細胞ターゲティング(B cell targeting : BCT)を報告した [10-12]。BCT法によって作製されるモノクローナル抗体の選択性はPEG法と比較して5-40倍の高い効率であることが示されている [10]。

1.3 近年のモノクローナル抗体の利用例

近年、モノクローナル抗体は幅広い分野で利用されており、特に、分子標的治療薬 (抗体医薬) や診断薬として、多大なる貢献をしている。分子標的治療薬の1つとして、抗 PD-1 抗体を使用した治療薬がある [13]。2018 年のノーベル生理学・医学賞を受賞した本庶らによって発見された T 細胞表面上に発現する PD-1 (受容体) は、癌細胞表面上に発現する PD-L1 (リガンド) と結合し、T 細胞の免疫反応を抑制することを見出した [14,15]。さらに、多くのがん細胞が PD-L1 を発現していることが示され、がん細胞自身が PD-1 と結合することによって、T 細胞の活性を抑制し、免疫応答から逃れようとしていることが発見された [16]。この発見によって抗 PD-1 抗体は革新的な癌治療として注目された (図 1-6)。

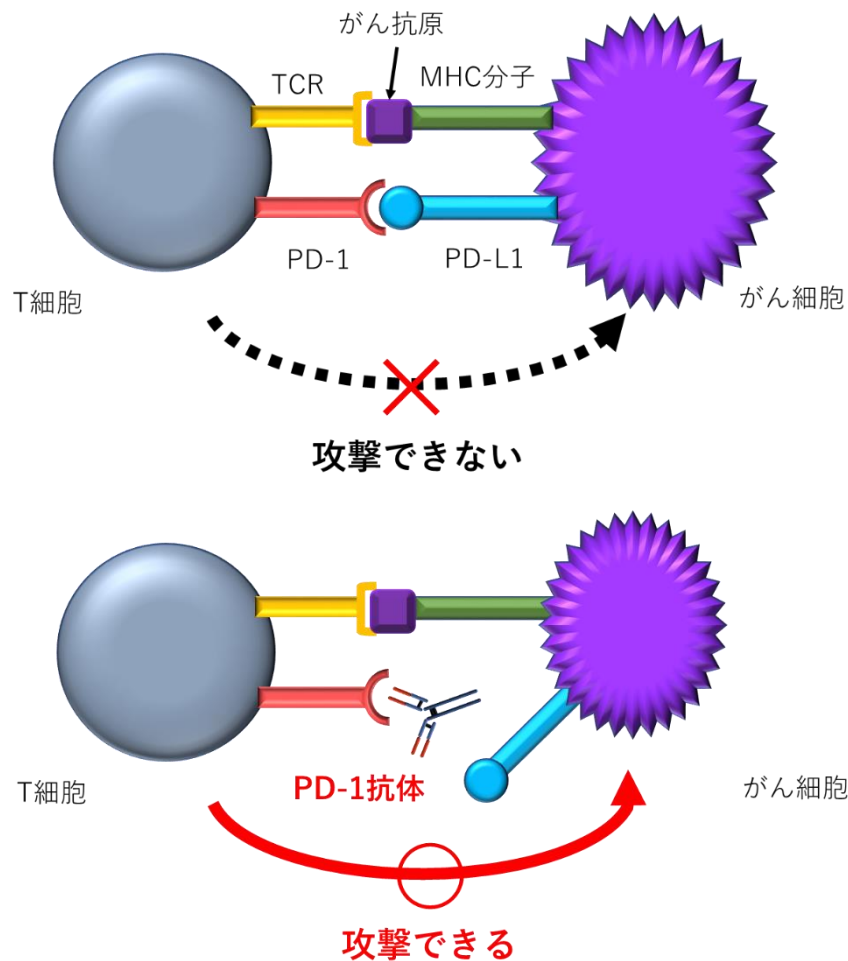


図 1-6 抗PD-1抗体の作用

2019年に重症急性呼吸器症候群コロナウイルス-2 (SARS-CoV-2) とも呼ばれる新しいコロナウイルス病 (COVID-19) が、中国の武漢で発生した [17]。このウイルスは、すぐに他の国に急速に広がり世界中でパンデミックを起こした。現在、コロナウイルス感染症を治療するための効果的な薬は開発されていないが、画期的なワクチンが開発されている [18]。多くの研究は、宿主細胞におけるウイルス侵入およびウイルス複製サイクルにおいて重要な機能を果たす「Sタンパク質」を標的とする抗ウイルス作用に焦点を合わせている [17]。特に、モノクローナル抗体は非常に注目されており、多くの中和モノクローナルが開発されている [19]。その多くは、Sタンパク質に対するモノクローナル抗体で、宿主細胞に発現するACE2タンパク質との結合を阻害することで、ウイルスの感染を防ぐことができる (図 1-7-1、図 1-7-2)。

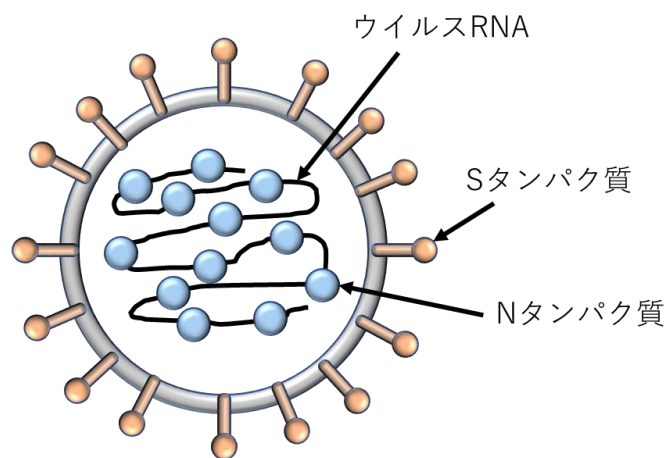


図 1-7-1 コロナウイルスの構造

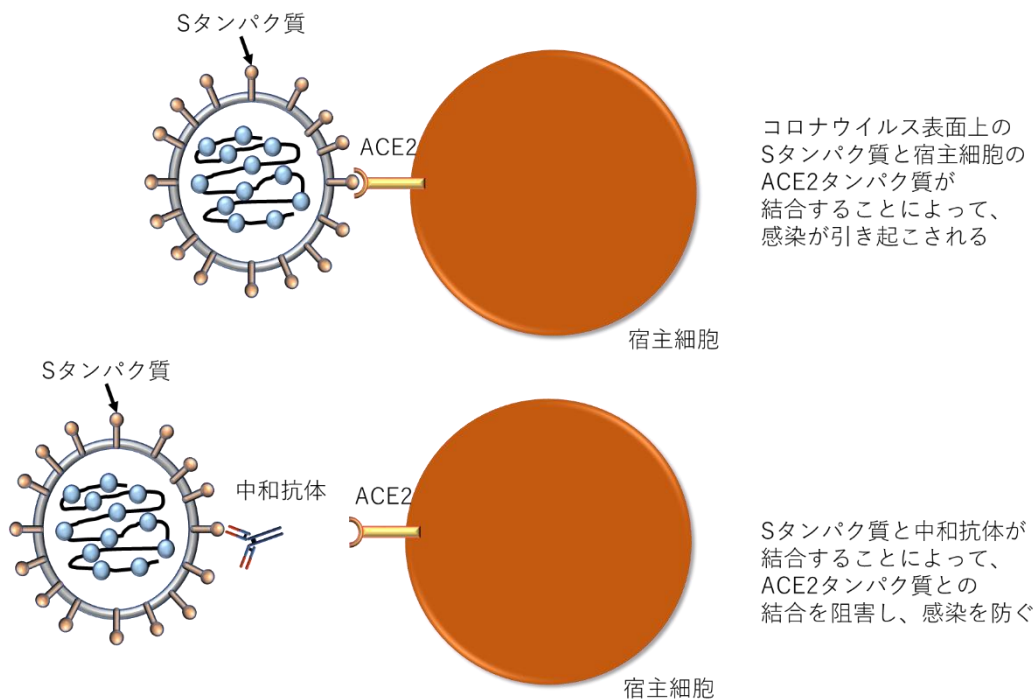


図 1-7-2 コロナウイルスに対する中和抗体の役割

さらに、モノクローナル抗体は検査薬としても有用であり、その代表例はインフルエンザの検査キットとである。インフルエンザ検査キットの原理は、金コロイド粒子修飾モノクローナル抗体にウイルス抗原が結合し、抗A型もしくは抗B型インフルエンザモノクローナル抗体に捕捉されることで、診断する(図 1-8) [20]。

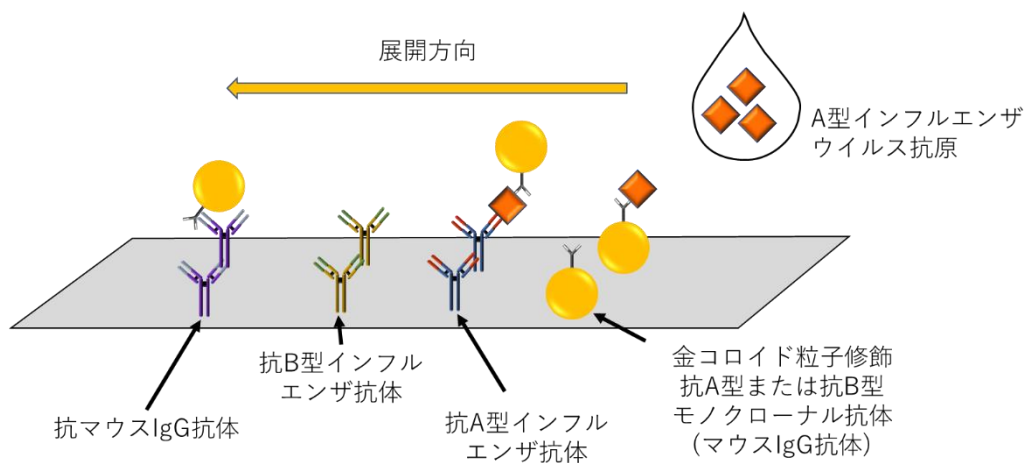


図 1-8 インフルエンザ検査キット

このように、モノクローナル抗体は分子標的治療薬や診断薬として、利用されており、その使用頻度は年々、拡大している。その他にも、研究用ツールとしてもモノクローナル抗体は有用であり、蛍光標識されたモノクローナル抗体やHRP標識抗体など、非常に幅広い分野で利用されている。

一般的なモノクローナル抗体の多くは、目的タンパク質の一次配列を認識している。しかし、生体内で機能する目的タンパク質は独自の立体構造を保持しており、分子標的治療薬などでモノクローナル抗体を利用する場合、目的タンパク質の立体構造 (天然構造) を認識することが極めて重要となる (図 1-9) [21]。

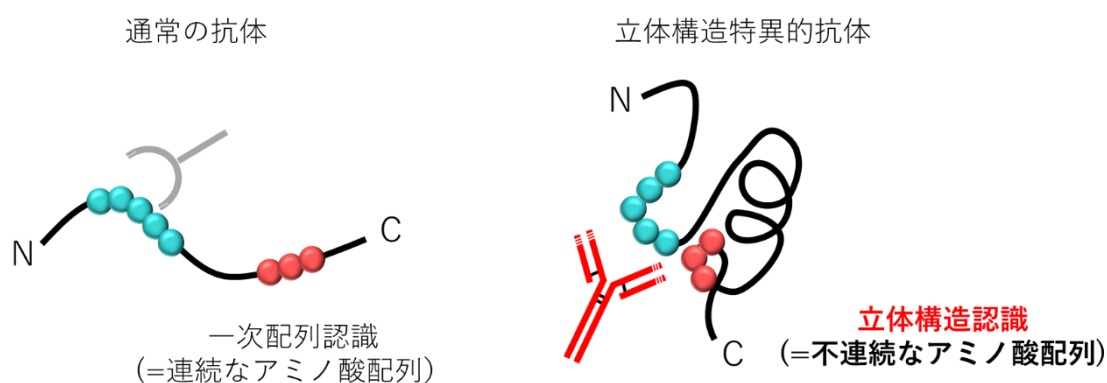


図 1-9 立体構造特異的モノクローナル抗体の特徴

抗体の認識部位は、一次配列および立体構造認識のどちらにおいても、目的抗原の 5-10 残基の連続した配列を認識していると考えられている。一次配列認識抗体の場合、一次構造上の連続したアミノ酸配列がエピトープとなる。一方、立体構造認識の場合、目的抗原の高次構造形成によって不連続なアミノ酸配列が、立体配座的に近くに存在し、あたかも連続したアミノ酸配列のように立体構造エピトープを形成すると考えられる。

1.4 立体構造特異的ターゲッティング (SST) 法

BCT 法は目的モノクローナル抗体を効率的に作製することができたが、1 つの大きな問題がある。それは、一次構造認識のモノクローナル抗体の効率的な作製を可能とするが、立体構造認識のモノクローナル抗体の作製には適していない。そこで、この方法をさらに改良することで、立体構造特異的モノクローナル抗体の効率的作製をめざした。その結果、私達はハイブリドーマテクノロジーに基づき「立体構造特異的ターゲッティング (Stereospecific targeting ; SST) 法」を世界に先駆け開発することができた [22-24] (図 1-10)。

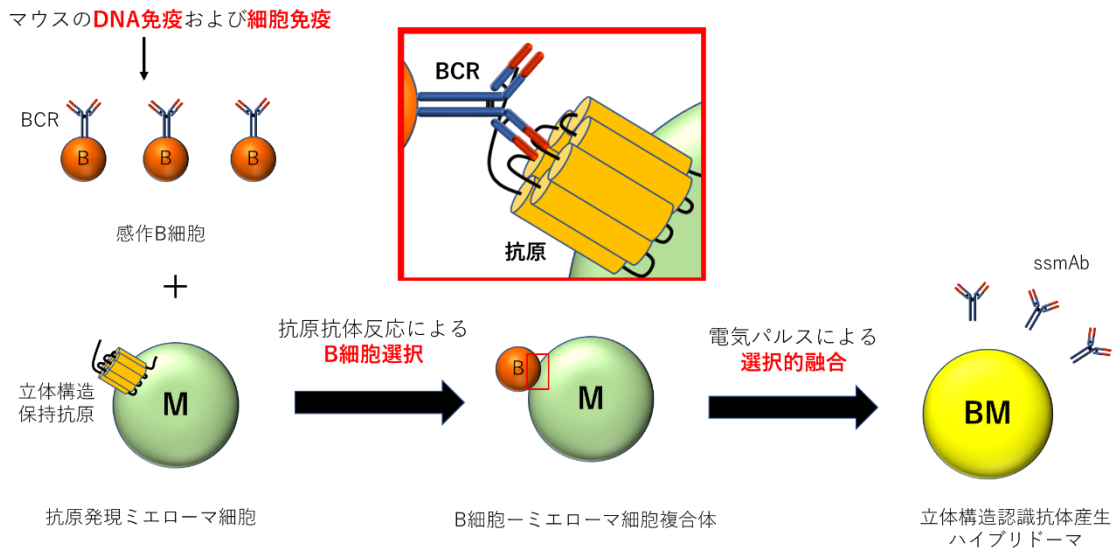


図 1-10 立体構造特異的ターゲッティング (SST) 法

SST 法にはいくつかの重要なポイントがある。1 つは、DNA を用いた免疫法である。DNA 免疫法ではマウスに対して目的遺伝子をコードする組換えプラスミド DNA を筋肉内に投与し、細胞内に導入することによって、目的抗原がマウス体内で発現される。このとき、発現される抗原は立体構造を保持しているため、免疫応答によって産生される感作 B 細胞は目的抗原の立体構造を認識する可能性が高くなる [25,26]。次のポイントは、抗原発現ミエローマ細胞を用いた目的の感作 B 細胞の選択にある。予め、遺伝子操作によってミエローマ細胞上に目的の抗原を高次構造を保持した状態で発現させることで、感作 B 細胞表面上の B

細胞受容体(B-cell receptor : BCR)を介した抗原抗体反応に基づき、立体構造認識抗体産生 B 細胞を選択できる。最後のポイントは、B細胞-ミエローム細胞複合体の選択的融合である。その目的のために電気パルスを利用した。直流矩形波(シルクハット型の電気パルス)の特徴は、膜を接する細胞のみを選択的に融合する [9]。その結果、目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを効率的に作製することができる。

SST 法に関してさらに詳しく述べる。立体構造認識モノクローナル抗体(ssmAb) 作製において最大のポイントの1つは、立体構造認識抗体産生感作 B 細胞をどのようにして効率的に得るかである。従来の抗体作製法で用いられるアジュバント(免疫賦活剤)を使用した方法では、目的抗原が変性しタンパク質本来の高次構造を破壊する。しかし、アジュバントを使用しないと免疫応答の効率が低くなる可能性がある。この問題を解決したのが DNA 免疫法である [25,26]。タンパク質を用いた免疫法と比較すると、DNA 免疫法はタンパク質の精製が必要なく、目的タンパク質を大量に調製する必要もない。DNA 免疫法による B 細胞の感作メカニズムは現在のところ、解明されていない。しかし、DNA を細胞内に投与することによって、マウス細胞内で目的タンパク質が立体構造を保持した状態で発現される。それによって、本来の高次構造が免疫系に認識され、目的の立体構造認識抗体産生 B 細胞の感作(分化)を促進すると考えられる。

コロナウイルスワクチンに含まれる mRNA も同様にインタクトなウイルス抗原を発現し、それが免疫システムによって認識され、抗体が産生されると推測される。今後、DNA、mRNA などの核酸を用いた免疫法は益々重要になると考えられる。ヒトへの応用は難しいが、近年では、DNA の脾臓内投与も検討されており、抗体反応を誘発するには、一回の投与で十分である可能性がある [27]。さらに、異なるタンパク質の遺伝子をコードする単一のプラスミド DNA を投

与することで、同時に異なるタンパク質に対する抗体を作製できることが報告されている [27]。DNA 免疫法は従来のタンパク質を用いた免疫法よりも優れている可能性がある。本研究における、DNA 免疫法を使用したモノクローナル抗体の作製は、膜貫通タンパク質を含む様々なタンパク質ですでに報告されている [28-30]。また、エレクトロポレーションを用いた DNA 免疫法は、幅広い条件下でも使用できることが報告されている [30-32]。

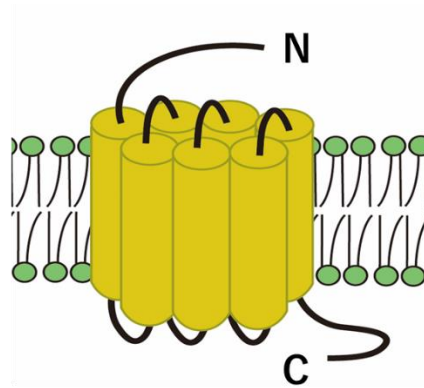
次のポイントは、DNA 免疫法によって獲得された立体構造認識抗体産生 B 細胞をどのようにして効率的に選択し、目的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作製するのがある。この問題はミエローマ細胞に対して目的抗原を発現させることによって解決した [33]。ただし、ミエローマ細胞は HEK293 細胞のような、トランスフェクションに使用される細胞と比較して、目的抗原の発現量が低いことが示されている [33]。しかし、本研究において、目的抗原発現ミエローマ細胞の安定発現株の作製に成功した。その結果、目的の感作 B 細胞を選択することができ、B 細胞-ミエローマ細胞複合体を効率的に形成することが可能になった。この複合体を電気パルスを用いた選択的融合によって、目的の抗体産生ハイブリドーマを作製した。

最後のポイントは、目的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングである。目的抗原を発現した付着性の CHO-K1 細胞を利用することで、細胞表面上に発現された目的抗原の立体構造に基づき、多くのサンプルの同時スクリーニングが可能になった。具体的には、Cell-ELISA 法によって、目的の立体構造特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを獲得した。

実際に、本研究において、SST 法によって作製されたハイブリドーマ陽性ウェル中 28.6% 以上のウェルで目的のモノクローナル抗体の産生を確認することができた。このように SST 法は、目的抗原の立体構造認識モノクローナル抗体を作製する画期的なハイブリドーマ作製技術であると考えられる。

1.5 CRHR1 について

本研究では G タンパク質共役受容体 (GPCR) の一つである human corticotropin-releasing hormone receptor 1 (huCRHR1) に対するモノクローナル抗体の作製を目ざした (図 1-11-1、図 1-11-2)。



Gタンパク質共役受容体 (GPCR)

図 1-11-1 GPCRの構造

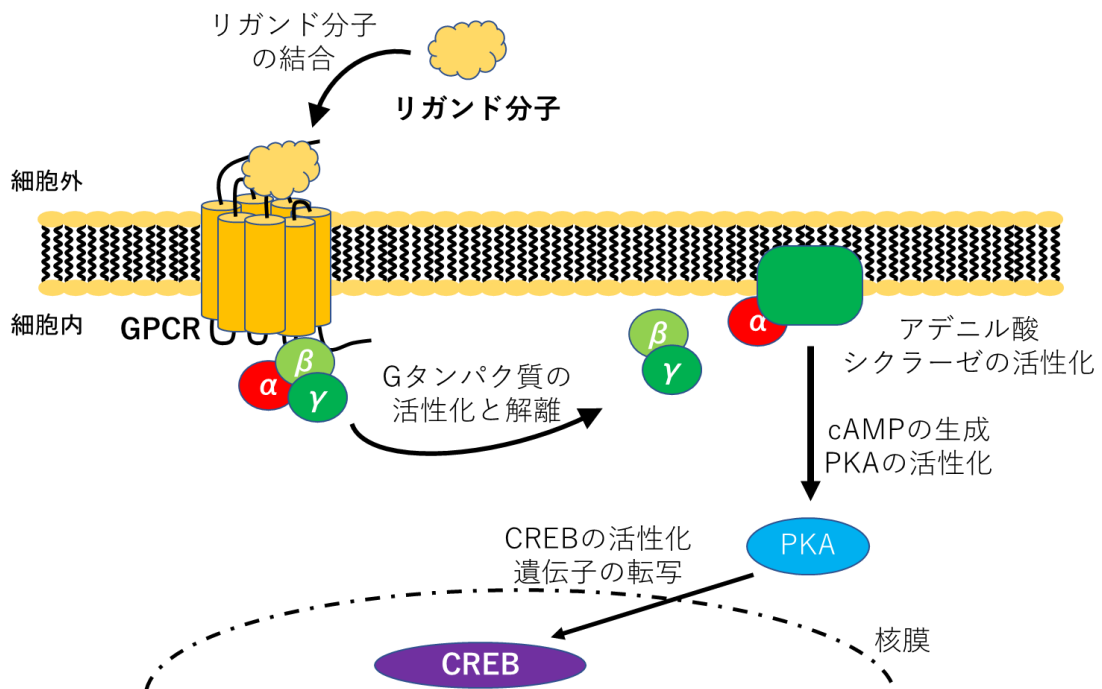


図 1-11-2 CRHR1を介したGPCRの活性カスケード

GPCR は 7 回膜貫通型タンパク質で多種多様な生理学的プロセスを調節し、細胞表面にアクセス可能な創薬結合部位をもっているため、薬理的標的として特に長年に亘り関心を集めてきた [34, 35]。現在、承認されている小分子から成る約 33 %は GPCR をターゲットにしている [36]。GPCR は、約 800 のメンバーを含む最大のヒト膜タンパク質ファミリーを形成し、約 400 のメンバーは嗅覚受容体である。その機能は外部刺激によって、細胞内シグナル伝達を媒介し、細胞増殖や細胞運動性を誘導する上で極めて重要な役割を果たすことが知られている [37, 38]。

GPCR はアミノ酸配列の類似性によって大きく 3 つに分けることができる。最大のファミリーはクラス A のロドプシンファミリーで、ロドプシン、アデノシン、メラノコルチン等の受容体が含まれており、C 末端にパルミトイル化システインと膜貫通ヘリックスに保存されたアミノ酸残基を有している [37, 39]。クラス B のセレクチンファミリーはセレクチンやグルカゴン受容体のような胃腸ペプチド受容体やコルチコトロピン放出ホルモン受容体等が含まれている 60 分子程度の小さいファミリーである。このファミリーの特徴は大きな N 末端領域をもち、複数のシステイン残基が含まれている [37, 39]。クラス C の代謝型グルタミン酸ファミリーは代謝型グルタミン酸およびカルシウム感知受容体等を含むファミリーである。このファミリーの特徴は非常に長い N 末端領域を有している [37, 39]。GPCR は、ほぼすべての生理学的機能を制御する中心的な役割を担っており、多くの病態生理学的プロセスにおける重要な関与が知られている [38]。そのため、GPCR 遺伝子の変異による活性化および不活性化は、悪性腫瘍を含む多くの病気の原因に成り得る。GPCR 機能の変化は内因性および外因性のリガンド分子や薬物効果に影響される。したがって、GPCR は創薬のターゲットとして非常に注目されている膜タンパク質である。

例えば、活性化 GPCR の疾患では、卵胞刺激ホルモン受容体 (FSHR) による

卵巣過剰刺激症候群 [40] や甲状腺刺激ホルモン受容体 (TSHR) における甲状腺機能亢進症および甲状腺がん [41] などがある。一方、不活性化 GPCR の疾患例として、TSHR における甲状腺機能低下症や甲状腺形成不全などがある [42]。

本研究の標的タンパク質 CRHR1 はうつ病、不安神経症などの主要な疾患の治療のための創薬ターゲットとして知られている [43]。CRHR1 のリガンド分子である corticotropin-releasing hormone (CRH) は 41 個のアミノ酸からなるホルモンペプチドで、ストレス応答の重要な調節因子である [44]。CRH は食欲制御、心血管調節、糖代謝、免疫機能および行動を含む幅広い生理学的反応に影響を及ぼすと知られている [43]。CRHR1 は主に下垂体前葉や新皮質領域、視床下部核などにおいて高レベルで発現している [43]。CRHR1 と CRH が結合すると G タンパク質にシグナルが伝達され、アデニル酸シクラーゼが活性化され、セカンドメッセンジャーである cAMP の生成により、PKA が活性化される。さらに、CREB などの細胞質および核標的の下流でリン酸化され、その結果、遺伝子転写が誘導される (図 1-11-2) [45]。このように、CRHR1 と CRH の結合は非常に重要な機能を有しており、CRHR1 の拮抗薬は、不安、うつ病、過敏性腸症候群などの様々なストレス関連適応症における治療の可能性について評価されている [43]。CRHR1 に対する立体構造特異的モノクローナル抗体を作製することができれば、CRH と同様な機能をもつアゴニスト作用や CRH の結合を阻害するアンタゴニスト作用を利用して不安症やうつ病等の今までにはない、新たな治療薬になる可能性がある。

1.6 本研究の目的

本研究では、ハイブリドーマテクノロジーに基づき、GPCR に対する立体構造特異的モノクローナル抗体のオリジナルな作製技術の創製とその医工応用を目的とした。この試みは世界で初めてであり、成功した場合、世界の分子標的治療薬の常識が覆る可能性がある。現在、多くのモノクローナル抗体の作製技術が開発されているが、作製されるモノクローナル抗体は目的タンパク質の一次配列を認識している。しかし、創薬の主要な標的として注目される GPCR を含む生体内で機能するタンパク質は、本来の高次構造を有しており、その立体構造を認識することが極めて重要である。

そこで、本研究では、GPCR の一つである huCRHR1 に着目し、「立体構造特異的ターゲッティング (SST) 法」に基づき、huCRHR1 に対する立体構造特異的モノクローナル抗体の高効率作製を目ざした。GPCR は 7 回膜貫通タンパク質のため複雑な構造をもっており、従来のモノクローナル抗体作製法では不可能と考えられている。本研究は、これまでの分子標的治療薬では標的にできなかったタンパク質に対しても応用できる可能性があり、さらに、新規感染症のような未知なるタンパク質に対してもその DNA 塩基配列が判明していれば、その応用も期待できる。

1.7 本論文の構成

第 2 章では、SST 法に基づき、立体構造特異的モノクローナル抗体を作製した。まず、2 種類の組換え細胞である huCRHR1 発現ミエローマ細胞および huCRHR1 発現 CHO-K1 を作製した。SST 法の重要なポイントの一つである B 細胞-ミエローマ細胞複合体形成についても、可視的に検討した。SST 法に基づき、立体構造特異的モノクローナル抗体を作製した。

第 3 章では、作製されたモノクローナル抗体の評価を行った。SST 法に基づき作製された抗体産生ハイブリドーマ上清中のモノクローナル抗体を解析した。さらに、精製されたモノクローナル抗体を用いて、Cell-ELISA 法、免疫蛍光染色法、ウェスタンブロッティング法、4% パラホルムアルデヒド処理やバキュロウイルス発現システムを用いた実験によって評価した。

第 4 章では、SST 法における DNA 免疫法の回数および免疫期間に基づき、クラススイッチ後の IgG モノクローナル抗体の効率的取得に着目した。SST 法において作製されたハイブリドーマを 3 つのグループに分け、抗体産生ハイブリドーマ上清中のアイソタイプの割合などを評価した。

第 5 章では、今回作製されたモノクローナル抗体の認識エピトープを予測した。アミノ酸配列に基づく解析と BepiPred-2.0 ツール、huCRHR1 の 3D 構造を使用した解析の 3 種類の評価法からモノクローナル抗体の立体構造認識エピトープを推測した。

第2章 立体構造認識モノクローナル抗体の作製

2.1 目的

モノクローナル抗体の多くは目的抗原の一次配列を認識している。しかし、分子標的治療薬 (抗体医薬) などの生体内で機能するタンパク質を標的とする場合、その立体構造を認識することが非常に重要になる [23]。近年、様々なモノクローナル抗体作製法が確立されているが、作製されるモノクローナル抗体の多くは目的抗原の一次配列を認識しており、立体構造を認識するモノクローナル抗体の作製は極めて困難である [21]。そこで、私たちの研究室で「立体構造特異的ターゲティング (SST) 法」を開発した [22-24]。SST 法の最大のポイントは目的抗原を立体構造を保持した状態で発現したミエローマ細胞によって、立体構造を特異的に認識する抗体を産生する感作 B 細胞を選択するところにある。

本章では、SST 法に基づき GPCR の 1 つである、huCRHR1 に対する立体構造特異的モノクローナル抗体の作製を目的とした。まず初めに、2 種類の組換え細胞を作製した。SST 法において、目的の感作 B 細胞を選択するための huCRHR1 発現組換えミエローマ細胞、また、Cell-ELISA 法で立体構造特異的モノクローナル抗体のスクリーニングや評価に使用する huCRHR1 発現組換え CHO-K1 細胞を作製した。その後、マウスに対して huCRHR1 の遺伝子をコードする組換えプラスミド DNA を用いて免疫化を行い、目的の B 細胞を感作した。融合実験の数日前に、最終免疫として、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を使用した。SST 法に基づき細胞融合を行い、目的の抗体産生ハイブリドーマを作製した。

2.2 材料および方法

2.2.1 材料

- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) : Nissui pharmaceutical
- E-RDF : 極東製薬工業
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 0.02% solution : Sigma Aldrich
- FCS : (コスモバイオ、gibco® by Life Technologies または Sigma Aldrich)
- Gene Ladder wide 1 : ニッポンジーン
- Geneticin® (G418) : gibco® by life technologies
- HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) medium : Sigma Aldrich
- HT (hypoxanthine, thymidine) medium : Sigma Aldrich
- HVJ Envelope VECTOR KIT 「GenomONE-Neo」 : 石原産業
- L-glutamine : Nissui pharmaceutical
- Lysing buffer : Sigma Aldrich
- RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) : Nissui pharmaceutical
- SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain : Life Technologies
- Goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with Alexa 568 : Invitrogen
- Goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) : Jackson ImmunoResearch
- Kanamycin sulfate : Meiji Seika Pharma
- OPD (*o*-phenylene diamine) : 東京化成工業
- アガロース : ナカライテスク
- イソフルラン : ファイザー
- 制限酵素処理試薬 (Xho I, Not I, 10 × H buffer, 10 × BSA, 10 × Triton X-100, 10 × Roding buffer) : タカラバイオ

- ・ 滅菌水：大塚製薬

2.2.2 Human CRHR1 組換えプラスミド DNA (ベクター) の確認

huCRHR1 組換えプラスミド DNA は前任者によって作製された [46]。具体的には、目的遺伝子を含むインサートに制限酵素処理を行い、Xho I サイトおよび Not I サイトを新たに付加した。その後、pBCMGS ベクターを Xho I サイトおよび Not I サイトで切断し、インサートとベクターをライゲーション処理により huCRHR1 組換えプラスミド DNA は構築された。目的遺伝子の挿入はその大きさ (kbp) に基づいて確認した。pBCMGS-huCRHR1 および pBCMGS-huCRHR1-tagGFP2 の組換えプラスミド DNA 0.5 μ L に対して、0.5 μ L の Xho I (制限酵素)、0.5 μ L の Not I (制限酵素)、2 μ L の 10 \times H buffer、2 μ L の 10 \times BSA、2 μ L の 10 \times Triton X-100 を加え、12.5 μ L の滅菌水を加え、全量を 20 μ L にした。その後、37 $^{\circ}$ C で 2 時間、反応させた後、サンプルに 2.2 μ L の 10 \times Roding buffer を加え、混合した。8% アガロースゲルにサンプル 6 μ L を加え、TAE buffer (40 mM Tris + 20 mM acetate + 1 mM EDTA) 中で 50 V、40 分間の条件で通電した。アガロースゲルは 10,000 倍希釈した SYBR Gold を加え、染色した。染色後、huCRHR1 組換えプラスミド DNA 由来のバンドの位置を確認した。

2.2.3 細胞培養

PAI マウスミエローマ細胞 [47] は、10% FCS、2 mM L-グルタミンおよび 100 μ g / mL 硫酸カナマイシンを添加した完全 RPMI1640 培地で、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下で培養した。

CHO-K1 細胞は、10% FCS を含む完全 E-RDF 培地にて、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下で培養した。

MDA-MB-231 細胞は、10% FCS、2 mM L-グルタミンおよび 100 μ g / mL 硫酸カナマイシンを添加した完全 DMEM 培地で、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下で培養した。

2.2.4 Human CRHR1 発現組換え細胞の作製

500 μL の PAI ミエローマ細胞 (1.0×10^5 cells / mL) または同量の CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells / mL) を 24 穴プレートに播種し、 37°C 、5% CO_2 存在下で培養した。翌日、pBCMGS-huCRHR1-TagGFP2 組換えプラスミド DNA によるトランスフェクションを、HVJ Envelope VECTOR KIT「GenomONE-Neo」を使用して、製造元のプロトコールに従って実施した。具体的には、20 μL の HVJ-E ベクターを $10,000 \times g$ 、 4°C 、5 分間遠心分離し、上清を除去した。HVJ-E ベクターペレットを 10 μL の pBCMGS-huCRHR1-TagGFP2 組換えプラスミド DNA (2.0 μg / μL) で懸濁し、1 μL の試薬 B を加え、タッピングによって混合し、 $10,000 \times g$ 、 4°C 、5 分間遠心分離し、上清を除去した。沈殿物を 15 μL の緩衝液で懸濁し、2.5 μL の試薬 C を添加し、タッピングによって混合した。最終的に、8 μL の組換え HVJ-E ベクター混合液を各ウェル中の細胞培養液に加え、 37°C 、5% CO_2 存在下で培養した。24~48 時間後、一過性発現した huCRHR1 を huCRHR1 の C 末端に結合した GFP の発現によって確認した。

安定発現 huCRHR1 発現ミエローマ細胞を得るために、一過性発現が確認された組換えミエローマ細胞を 500 μg / mL G418 入り完全 RPMI1640 培地で 10~14 日間培養することで選択した。安定発現 huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞の場合は、完全 E-RDF 培地および 1,300 μg / mL の G418 を使用して、上述の様に細胞培養後、取得した。

2.2.5 マウスの免疫化 (DNA 免疫法および細胞免疫法)

BALB/cA Jcl マウス(5 週齢)に対してイソフルランを用いて麻酔した後、組換えプラスミド DNA (pBCMGS-huCRHR1) を DNA 免疫のためにマウスの大腿筋に注射した。初回免疫では 50 μL 、追加免疫では 30 μL の組換えプラスミド DNA (1.0 μg / μL) をそれぞれ使用した。組換えプラスミド DNA を細胞に効果的に導

入するために、注射した部分を挟むように 5 mm 幅の 2-Needles Array を大腿筋に数 mm 差し込み、直流矩形波の電気パルスを印加 (voltage : 200 V/cm、 pulse length : 20 msec、 4 pulses, interval : 1 sec) することによって遺伝子導入を行った。3 週間間隔で 3~4 回の DNA 免疫法を行った後、PBS に懸濁した約 1×10^7 cells の huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を、融合の 3 日から 5 日前に最終免疫として腹腔内に注射投与した。

2.2.6 立体構造特異的ターゲティング (SST) 法 (図 1-10)

立体構造特異的ターゲティング (SST) 法に基づき、立体構造特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製した。DNA 免疫法および細胞免疫法によって感作されたマウスをイソフルランを用いて麻酔を行った。マウスの腹部あたりから切り込みを入れ、腹部から首あたりまで切開した。その後、麻酔が切れる前に心臓から血液を回収した。次に、マウスから脾臓を無菌的に取り出し、ラバーポリースマンによって脾臓から脾細胞を取り出し、2,000 rpm ($800 \times g$)、5 分間遠心分離し、上清を除去後、5 mL の Lysing buffer を加え、 4°C にて 5 分間放置して赤血球を溶解した。45 mL の $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ 硫酸カナマイシン入り DMEM (DMEM⁺) に懸濁後、再度、 $800 \times g$ 、5 分間遠心分離し、10 mL の DMEM⁺ で洗浄した。 $800 \times g$ 、5 分間遠心分離し、沈殿を 5 mL の DMEM⁺ で懸濁することで B 細胞を含む脾細胞懸濁液を調製した。

huCRHR1 発現ミエローマ細胞 ($2.0-3.0 \times 10^7$ cells) をフラスコから回収し、800 rpm ($130 \times g$)、5 分間遠心分離した。その後、DMEM⁺ で洗浄を行い、最終的に 5 mL の DMEM⁺ で懸濁することで huCRHR1 発現ミエローマ細胞懸濁液を調製した。脾細胞および huCRHR1 発現ミエローマ細胞の生存率と細胞数を測定し、脾細胞数と huCRHR1 発現ミエローマ細胞数が 4 : 1 の割合になるように混合した。混合溶液を、1,000 rpm ($200 \times g$)、10 分間遠心分離し、1 mL の DMEM⁺ に懸

濁し、4°C、30分間、静置した。次に、4 mL の DMEM⁺を加え、全量を 5 mL にし、4°C、30分間、ゆっくりとローテーションした。このステップで、目的の感作 B 細胞は B 細胞受容体 (BCR) を介した抗原抗体反応に基づき huCRHR1 発現ミエローマ細胞上の huCRHR1 によって選択され、B 細胞-ミエローマ細胞複合体を形成した。複合体形成後、200 × g、10分間遠心分離し、上清を完全に除去後、2-3 mL のスクロース等張緩衝液 [0.25 M sucrose in 2 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.2) containing 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgCl₂] で懸濁した。1 回の融合当たり、0.5 - 1.0 mL の B 細胞-ミエローマ細胞複合体を含む細胞懸濁液を白金電極内に入れ、2.0 - 3.0 kV / cm の直流矩形波の電気パルスを 1 秒間隔で 4 回繰り返し負荷して、選択的に融合した。

電気パルス融合を行う場合、2つのポイントがある [9,48]。細胞同士の 1) 接触と 2) 選択的融合である。1つ目の細胞同士の接触においては、B 細胞受容体 (BCR) と目的抗原とが抗原抗体反応を利用して B 細胞-ミエローマ細胞複合体を形成できる。2つ目の選択的細胞融合は、電気パルスによって膜に電位差が生じ、細胞膜に細孔が生じる。その後、細孔が閉じる際に細胞膜を接している細胞間で膜融合が起こる [49]。この時、膜を接していない細胞は、決して融合しない。このような原理で、細胞融合が起こる。融合後、ハイブリドーマを含む融合細胞を HAT を含む完全 RPMI 1640 培地に加え、1時間静置した後、96 穴プレートに播種した。HAT 培地で 2 週間、HT 培地でさらに 2 週間培養することによって、ハイブリドーマを選択した。

融合前に、B 細胞-ミエローマ細胞複合体を観察するために免疫蛍光染色法を行った。細胞懸濁液を PBS で洗浄し、1 / 1,000 倍希釈した Alexa568 標識抗マウス抗体を添加し、4°C で 1 時間、ローテーションした。この操作によって B 細胞が赤色に蛍光標識される。PBS で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光観察した。

2.2.7 Cell-ELISA 法 (図 2-1)

300 - 350 μ l の huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells / mL) およびコントロール CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells / mL) を 96 穴プレートに播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下で 2 日間培養した。各ウェルを PBS で洗浄した後、50 μ L のハイブリドーマ上清または希釈したマウス血清を添加し、4 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、1 / 10,000 倍希釈した goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) を二次抗体として添加し、4 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。各ウェルを PBS で少なくとも 5 回洗浄し、発色試薬 [0.1 M sodium citrate buffer (pH = 5.2) + *o*-phenylene diamine (1 mg/ml) + 0.02% H₂O₂] を 50 μ L / ウェル加え 37 $^{\circ}$ C で 10-20 分間インキュベートし、1 M H₂SO₄ を 50 μ l / ウェル加え反応を止め、490nm で吸光度を測定した。

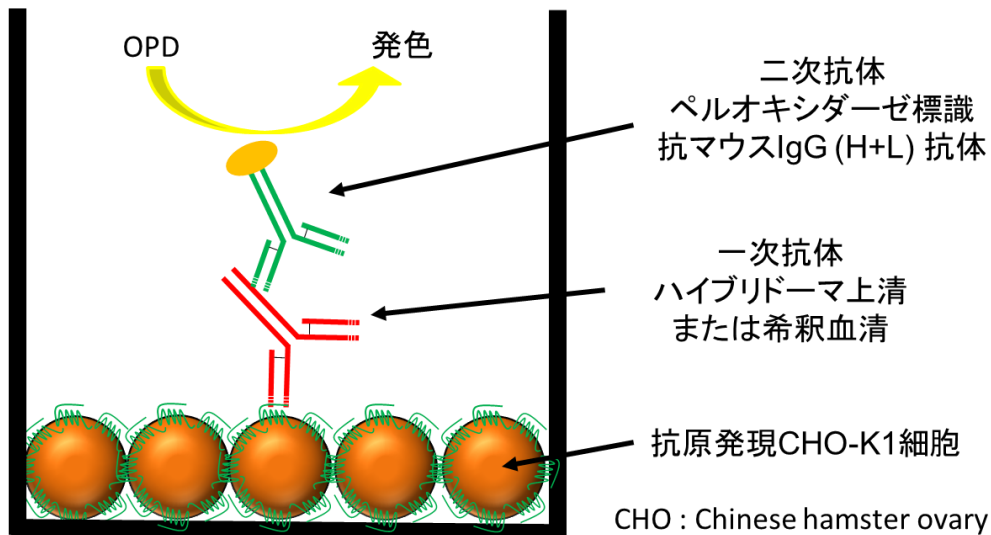


図 2-1 Cell-ELISA 法

2.2.8 限界希釈法 (図 2-2)

Cell-ELISA 法によって huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対して高い抗体価を確

認できたハイブリドーマを、限界希釈法によってクローン化を行った。一次スクリーニングで確認されたウェルには、複数種類のハイブリドーマが混在している可能性がある。そこで、ハイブリドーマを非常に薄い濃度で培養することで、単一クローンのみを増殖させることを目的としクローン化を行った。具体的には、細胞濃度を 45、15、5、2.5 cells/mL になるように希釈調製し、96 穴プレートに 200 μ L ずつ播種した。その後、2 週間程度、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下で培養した。

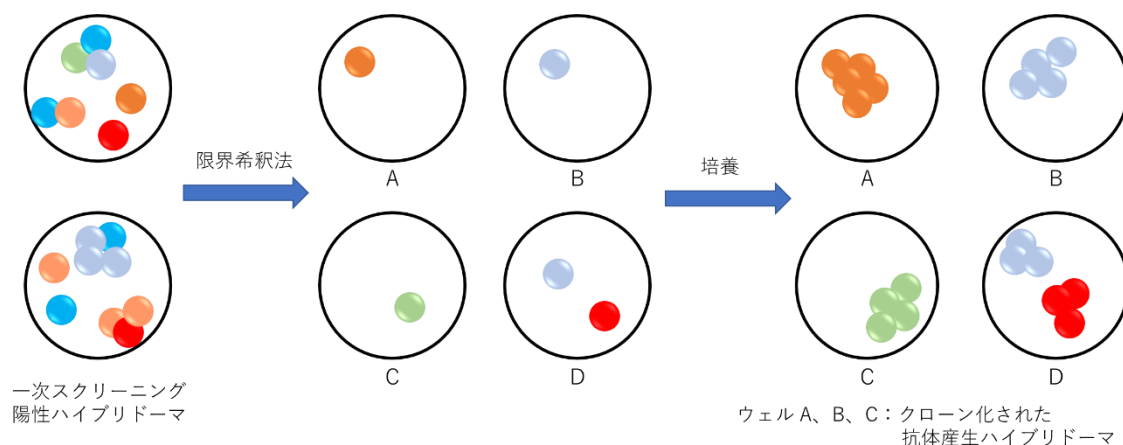


図 2-2 限界希釈 (Limiting dilution) 法

2.3 結果および考察

2.3.1 Human CRHR1 発現組換え細胞の作製

本実験で使用した huCRHR1 組換えプラスミド DNA の模式図を図 2-3 に示した。ベクターとして pBCMGS-Neo を用いて行った。

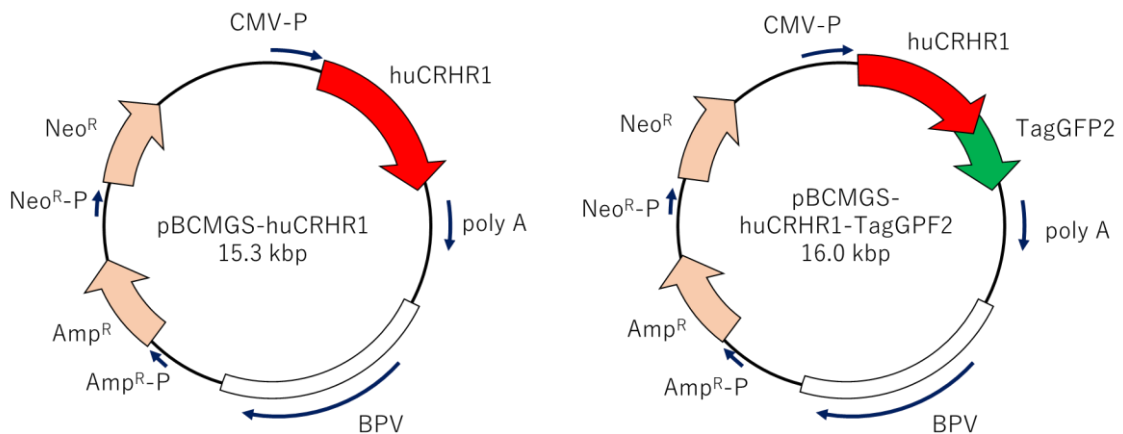


図 2-3 huCRHR1組換えプラスミドDNA

CMV-P はサイトメガロウイルスプロモーター、BPV はウシパピローマウイルス、Amp^R (アンピシリン耐性遺伝子) は β -ラクタマーゼをコードする、Neo^R はネオマイシン (G418) 耐性遺伝子、poly A はポリアデニレートアタッチメントシグナルを示す。また、Amp^R-P および Neo^R-P は各耐性遺伝子のプロモーターを表す。Amp^R または Neo^R 遺伝子によって発現されるタンパク質は、細胞増殖を阻害する抗生物質アンピシリンまたはネオマイシンの存在下においても、各抗生物質を無効化して細胞増殖を可能にする。pBCMGS-Neo は大腸菌の複製起点と真核細胞内での複製能力を持つシャトルベクターとして機能することが知られている。さらに、ウシパピローマウイルスの遺伝子の一部部分が組み込まれており、マウスなどの齧歯類の細胞で自己複製することが知られている。そのため、核内のゲノムに取り込まれなくても発現が可能である。本研究において、pBCMGS-Neo を用いることによって、目的遺伝子の DNA 免疫法やトランスフェ

クシヨンの効果を促進させることができると判断した。特に、DNA 免疫法によってマウス体内の細胞に導入した際に、長期間の発現が期待され、免疫応答が促進されることによって、目的の抗体産生 B 細胞の効率的感作に大きく寄与すると考えられた。また、細胞導入時の一細胞あたりのコピー数が 50 - 10,000 に複製され、トランスフェクションにおける高発現細胞の作製に適していると考えられる。各組換えプラスミド DNA は Xho I および Not I の制限酵素によって処理され、アガロースゲル電気泳動によって確認した (図 2-4)。

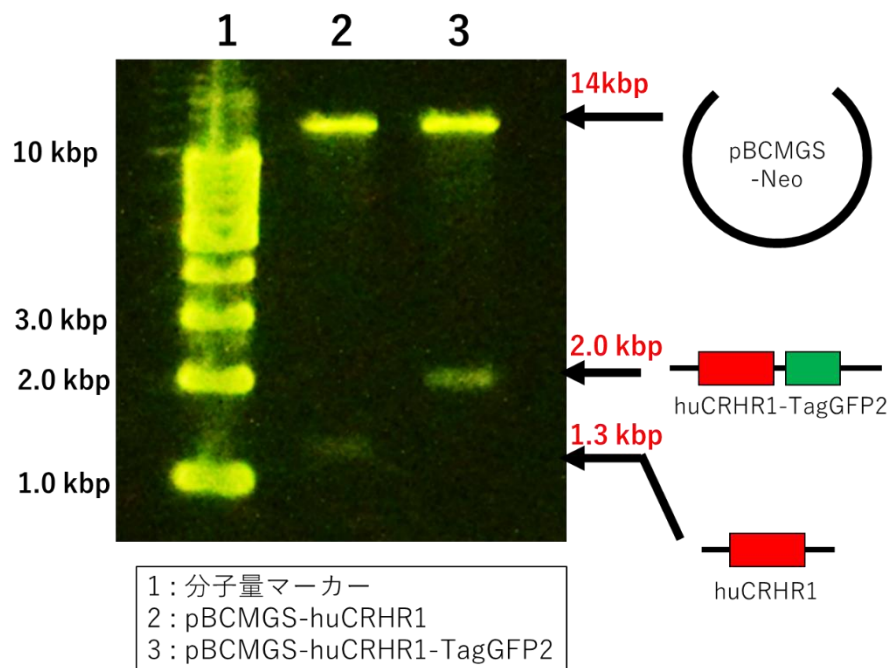


図 2-4 huCRHR1組換えプラスミドDNAの確認

pBCMGS-huCRHR1 のレーン 2 においては、約 14 kbp と約 1.3 kbp 付近にバンドが確認できた。一方、pBCMGS-huCRHR1-TagGFP2 のレーン 3 では、約 14 kbp と約 2.0 kbp 付近にバンドが確認できた。これらの値は、文献値と一致するため、目的の遺伝子である huCRHR1 または huCRHR1 + GFP が導入された組換えプラスミド DNA であると判断した。

次に、組換え細胞を作製する際に重要なポイントとして、各細胞における選

培養地中の抗生物質の最適濃度を見極める必要がある。そこで、遺伝子導入前のミエローマ細胞および CHO-K1 細胞に対して、G418 (ネオマイシン) の各濃度における培養状態を検証した。G418 はリボソームに結合し、原核細胞と真核細胞の両方で翻訳伸長を阻害するため、タンパク質合成と細胞増殖を妨害する。G418 に対する耐性 (無毒化) は、ネオマイシン耐性遺伝子がコードするネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II などのホスホトランスフェラーゼ (リン酸転移) 酵素の発現を介して付与される [50]。ミエローマ細胞の結果を図 2-5 および図 2-6 に示した。

ミエローマ細胞：0日目

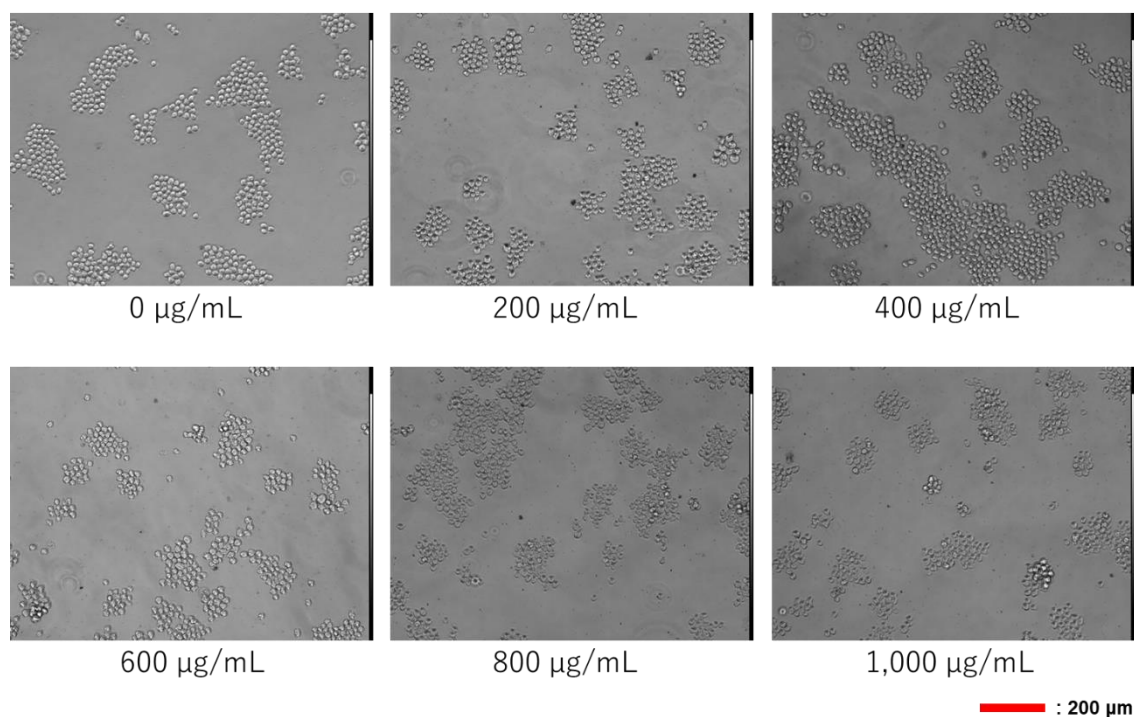


図 2-5 G418濃度の検証：ミエローマ細胞 培養0日目

ミエローマ細胞：7日目

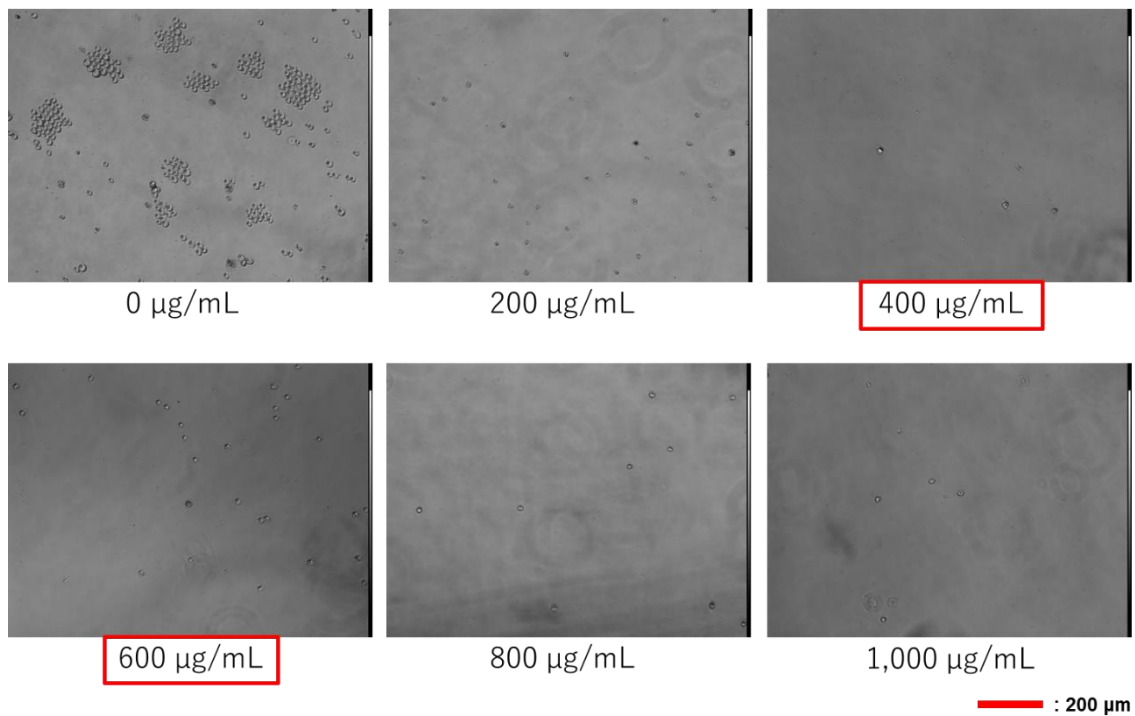


図 2-6 G418濃度の検証：ミエローマ細胞 培養7日目

G418 存在下で7日後の細胞の状態を確認したところ、200 µg/mL 以上の濃度では十分な細胞増殖が確認できず阻害された。この結果から、ミエローマ細胞の増殖を抑制するために十分量の 500 µg/mL の濃度で組換えミエローマ細胞を選択することにした。

CHO-K1 細胞の結果は図 2-7 および図 2-8 に示した。

CHO-K1細胞：0日目

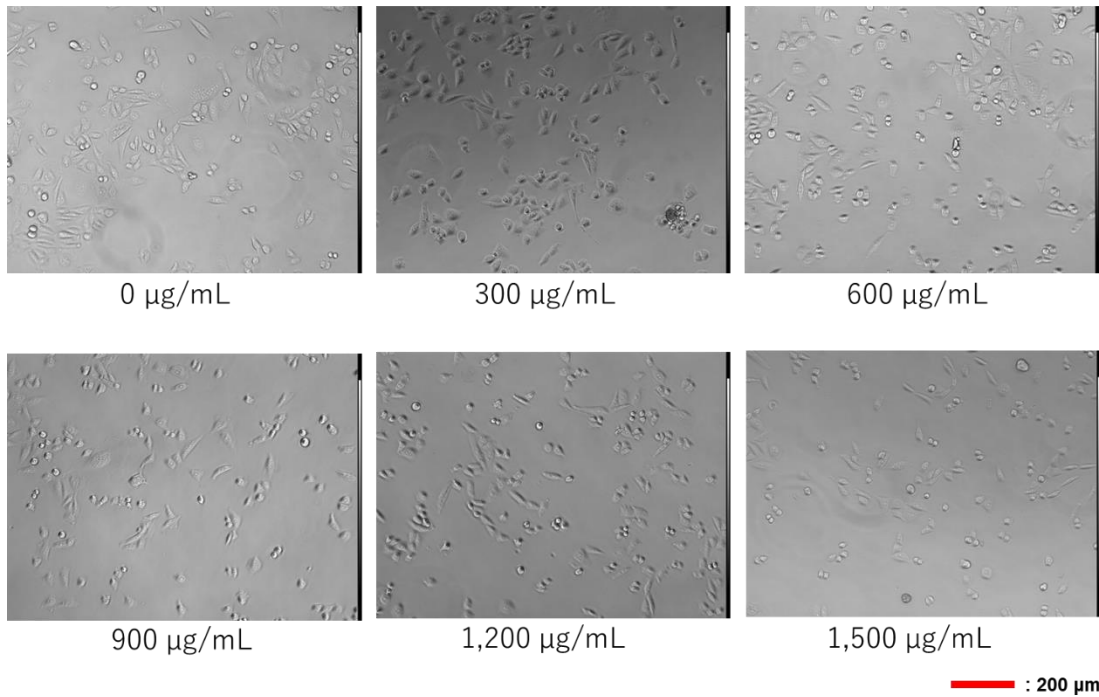


図 2-7 G418濃度の検証：CHO-K1細胞 培養0日目

CHO-K1細胞：7日目

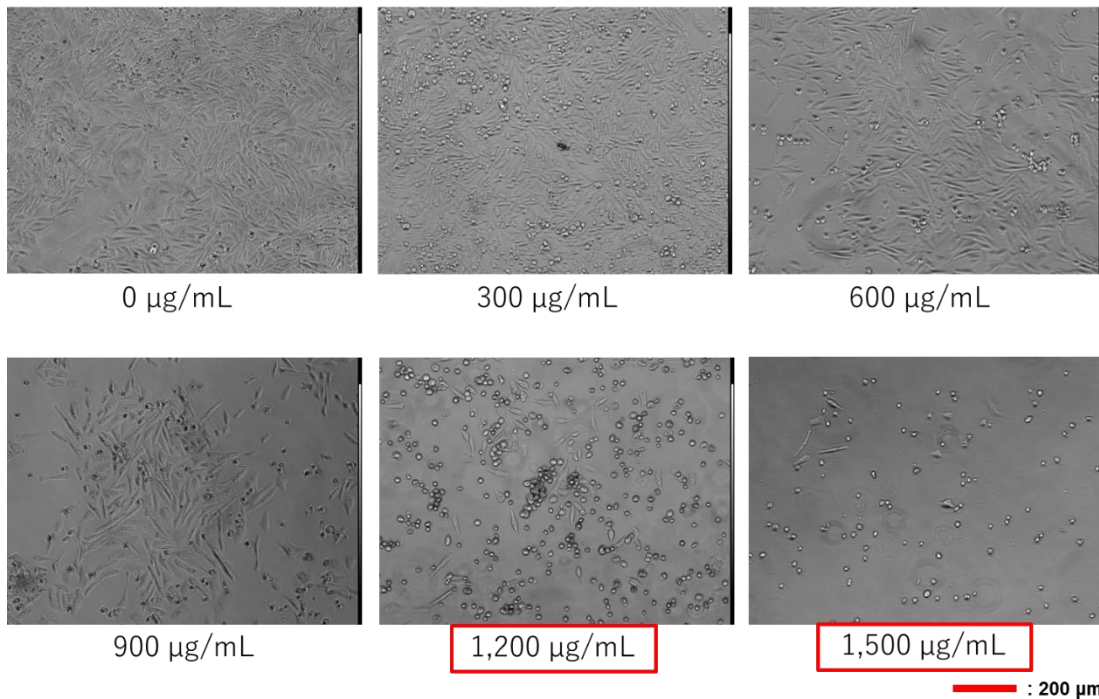


図 2-8 G418濃度の検証：CHO-K1細胞 培養7日目

ミエローマ細胞と同様に、G418 存在下で 7 日後の細胞の状態を確認したところ、300 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度では、細胞の減少はほとんど見られなかったが、細胞の形が丸くフラスコ底面に接着してない細胞が見られた。600 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度において、細胞数の減少が少し見られ、細胞の形が丸くフラスコ底面に接着してない細胞が確認された。また、900 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度では、フラスコ底面に接着している細胞が約半数程まで減少した。1,200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度では、フラスコ底面に接着している細胞が約 3 割程度まで減少し、ほとんどの細胞が丸い形を形成していた。1,500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度においては、フラスコ底面に接着している細胞がほとんどなく、ほぼすべての細胞が丸くフラスコ底面に接着せず浮遊していた。これらの結果から、組換え CHO-K1 細胞の選択では、1,300 $\mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度で行うことにした。

上記、2 種類の組換え細胞の作製には、組換えプラスミド DNA として pBCMGS-huCRHR1-TagGFP2 を用いて HVJ Envelope VECTOR KIT 「GenomONE-Neo」に基づき細胞へのトランスフェクションを行った。具体的には、HVJ-E ベクター内に目的遺伝子を含む組換えプラスミド DNA を封入した。次に、HVJ-E エンベロープ上に発現している HN (hemagglutinin-neuraminidase) タンパク質と細胞膜表面上の膜タンパク質内に存在するシアル酸とが結合し、F タンパク質によって膜融合を引き起こし、その過程で細胞内に組換えプラスミド DNA が導入される [51] (図 2-9)。

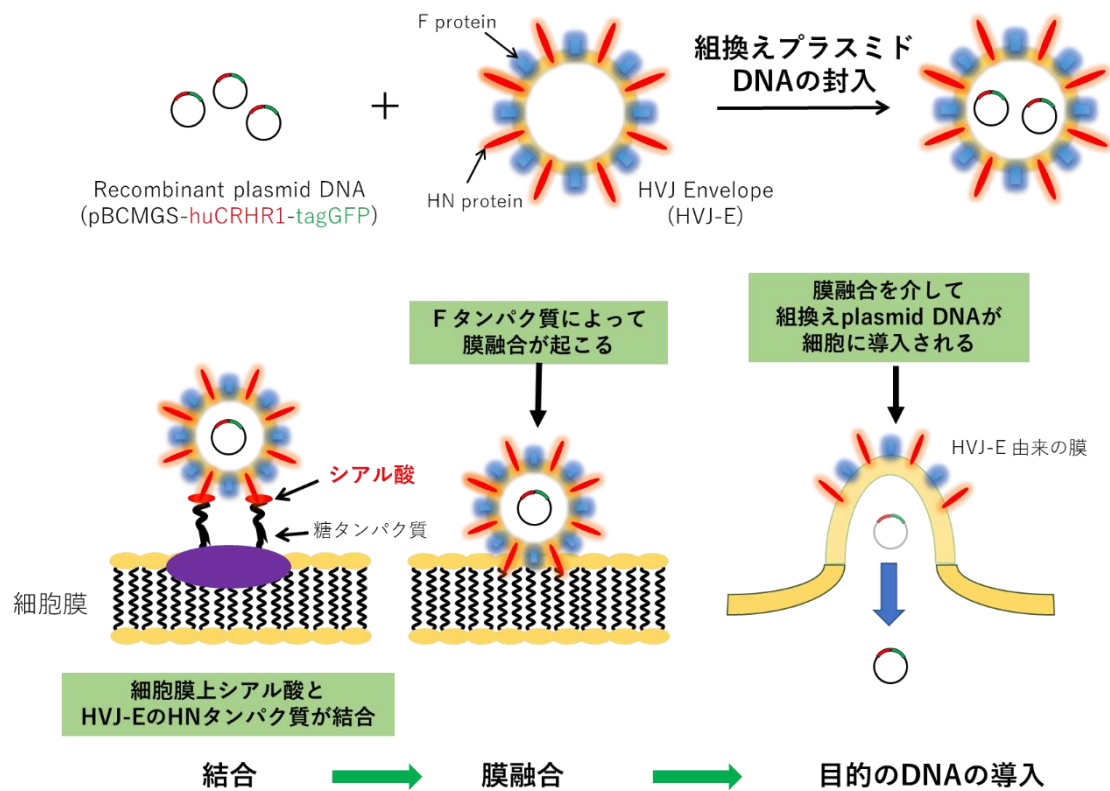


図 2-9 トランスフェクションの原理

ミエローマ細胞および CHO-K1 細胞に対して pBCMGS-huCRHR1-TagGFP2 を導入し、G418 存在下で 2 週間培養した。その時、組換えミエローマ細胞の選択は 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、また、組換え CHO-K1 細胞の選択には 1,300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の G418 を培地に加えた。その後、共焦点レーザー顕微鏡で huCRHR1 の C 末端側に結合している GFP の蛍光を確認することで、間接的に huCRHR1 の発現を確認した。その結果を、図 2-10 および図 2-11 に示した。

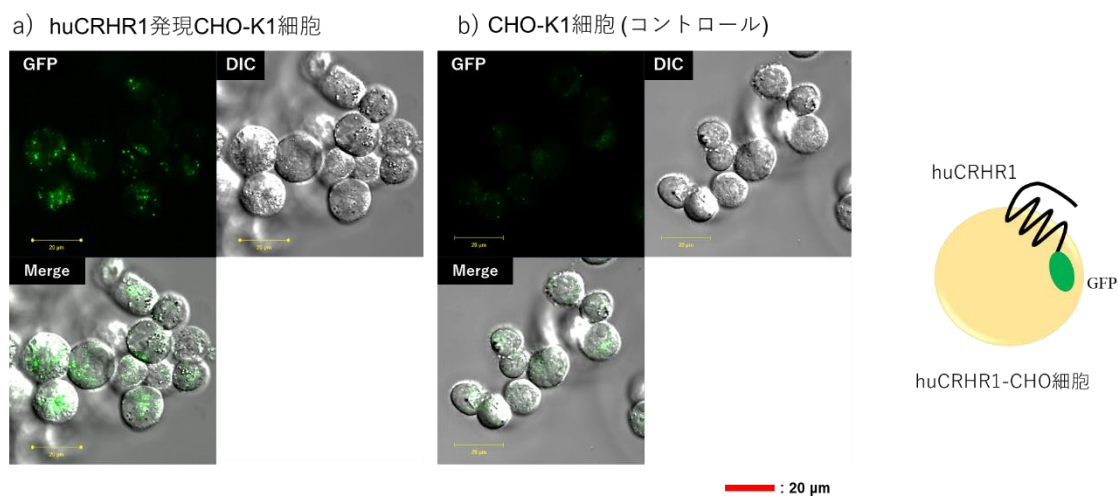


図 2-10 huCRHR1発現CHO-K1細胞

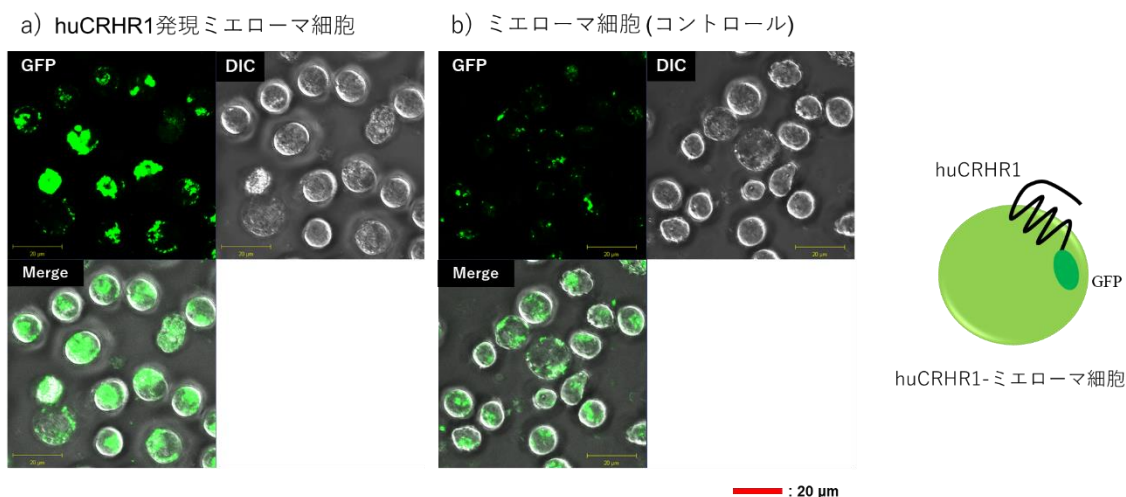


図 2-11 huCRHR1発現ミエローマ細胞

huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞の場合、コントロール細胞と比較して GFP の蛍光が確認できたが、細胞膜上のきれいな蛍光とはならなかった。huCRHR1 発現ミエローマ細胞の場合、コントロール細胞と比較して強い GFP の蛍光が見られ、一部の細胞では膜上に GFP の蛍光が認められた。どちらのコントロール細胞においても、弱い緑色蛍光が確認された。特に、ミエローマ細胞において、その傾向はより顕著であった。これは細胞自身の自家蛍光であると考えており、huCRHR1 発現細胞と比較する蛍光強度が弱いことから、目的抗原の huCRHR1 は細胞上に発現されていると判断した。

2.3.2 立体構造特異的ターゲティング (SST) 法に基づくモノクローナル抗体の作製

本研究では、2種類の免疫法を行った。すなわち、マウスに対して huCRHR1 組換えプラスミド DNA を用いた DNA 免疫法と huCRHR1 発現組換え細胞を用いた細胞免疫法を組み合わせた。DNA 免疫法の特徴として、目的遺伝子がマウスの細胞で発現されるため、目的抗原は本来の高次構造を有している。そのため、通常のアジュバント存在下で変性した抗原を用いた免疫化よりも、目的抗原に対して立体構造を認識する抗体が産生される割合が高くなると考えられる [25, 26]。さらに、組換えプラスミド DNA を投与するため、精製が困難な GPCR のような 7 回膜貫通の複雑な構造をもつタンパク質に対しても有用であると考えられる。実際、膜タンパク質のような複雑な構造のタンパク質に対して DNA を用いた免疫法が行われている [28-31]。DNA 免疫法のみ感作では、抗体価の上昇が従来の免疫法と比較して緩やかであるため、本研究では、DNA 免疫法を数回行った後、最終免疫として立体構造を保持した目的抗原 (huCRHR1) を発現する CHO-K1 細胞を投与することによって、抗体価の上昇の改善を試みた [52]。その結果、最終免疫から 5 日後に抗体価の著しい上昇を Cell-ELISA 法によって確認することができた (図 2-12)。

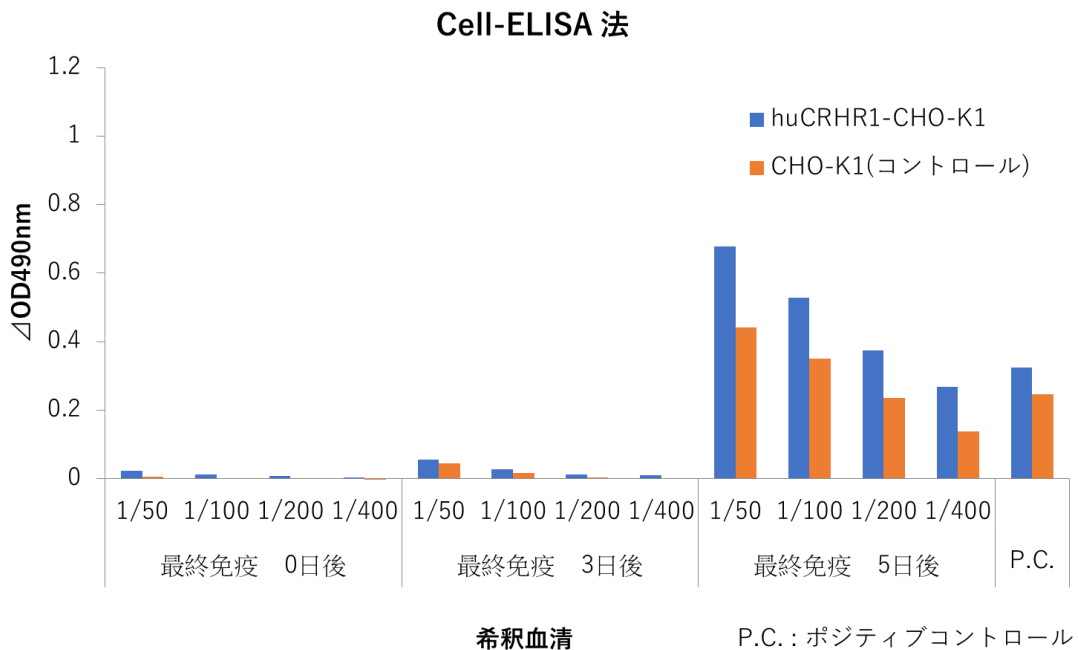


図 2-12 最終細胞免疫からの抗体価上昇の推移

この結果は、DNA 免疫法と比較すると、細胞免疫法では、生体内で目的タンパク質を遺伝子から発現する必要がないため、免疫応答までの期間が短いと推測された。また、DNA 免疫法と huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を用いた細胞免疫法では、抗原量に大きな違いがあると考えている。DNA 免疫法において、投与した組換えプラスミド DNA の遺伝子がすべて発現されるとは考えにくく、発現量が不確定である。一方、huCRHR1 発現 CHO 細胞では、細胞表面に目的抗原が発現されているため、発現量は比較的多いと考えられる。従って、huCRHR1 発現 CHO 細胞で免疫化することによって、細胞表面に発現された目的抗原を認識するメモリーB 細胞 (DNA 免疫法によって予め感作された B 細胞) が速やかに活性化され、免疫応答が促進された結果、抗体価の上昇に繋がったと考えている。

ここで、立体構造認識モノクローナル抗体の作製には DNA 免疫法が本当に有効なのかという 1 つの疑問が生じた。現在までに複雑な構造を有する膜タンパク質に対する抗体を作製する場合、目的のタンパク質の精製が困難であること

から DNA 免疫法を利用していると考えられる [28-31]。本研究では、組換え細胞の作製にも成功し、最終免疫としてマウスに投与している。組換え細胞には目的タンパク質が多く発現されており、抗体価の上昇を確認できたことから免疫原としても有用である可能性が示唆された。今後、細胞免疫法のみで抗体産生 B 細胞が感作されるかを検討していきたい。ただし、この場合、抗原発現 CHO 細胞の繰り返し投与によって、CHO 細胞上の目的以外のタンパク質に対する抗体も産生されることを考慮する必要がある。

マウス血清中に目的の抗体が含まれていることから、目的の抗体産生感作 B 細胞が存在すると考えられた。そのため、SST 法のポイントの一つである抗原発現ミエローマ細胞による感作 B 細胞の選択を検討した。免疫化マウスから脾臓を取り出し、感作 B 細胞を含む脾細胞懸濁液を調製した。huCRHR1 発現ミエローマ細胞を加え、ゆっくりとローテーションを行い、B 細胞-ミエローマ細胞複合体を形成させた。その後、Alexa568 標識抗マウス抗体を用いて感作 B 細胞を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を観察した。その結果、感作 B 細胞と huCRHR1 発現ミエローマ細胞との複合体を確認することができた (図 2-13)。

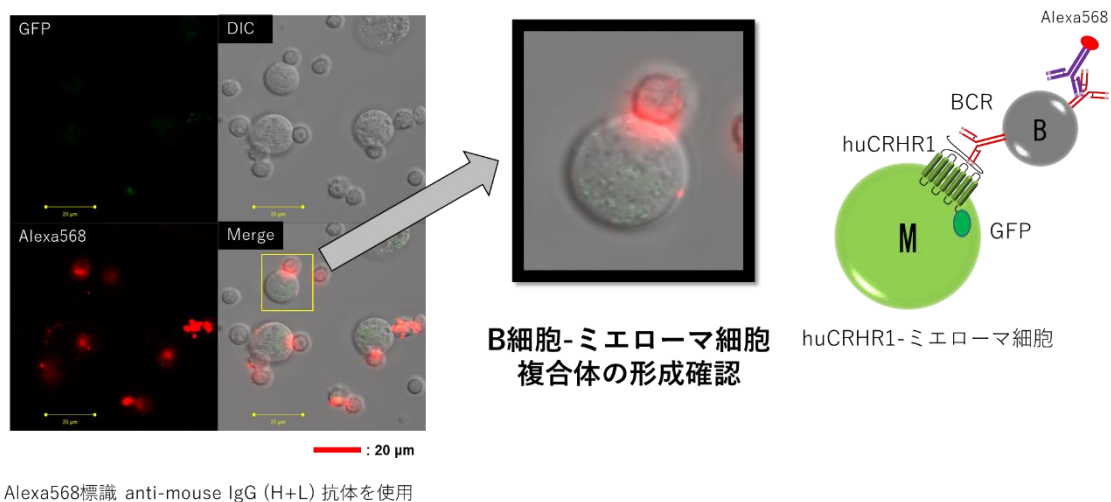


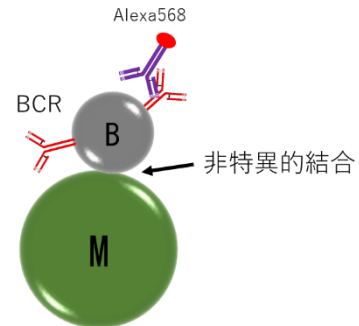
図 2-13 B細胞-huCRHR1発現ミエローマ細胞複合体

この時、多くの B 細胞とミエローマ細胞は 1:1 で複合体を形成していた。一部の複合体は 1 つのミエローマ細胞に対して、複数の B 細胞の結合が確認された。複合体形成時の脾細胞とミエローマ細胞の割合は 4:1 になるように調製している。脾細胞懸濁液には、目的の B 細胞を含んでいるが、その割合はかなり低いと考えている。そのため、実際はミエローマ細胞に対して目的の B 細胞は非常に少ないと考えている。さらに、ミエローマ細胞上の抗原によって BCR を介した抗原抗体反応が開始されると抗原が結合部位近傍に集結すると考えられるため、結合部位以外の抗原濃度が薄くなり、新たな B 細胞がミエローマ細胞に結合する確率は低下すると推測される。万が一、2 個以上の B 細胞とミエローマ細胞が融合したとしても、染色体が $6n$ 以上になり、核の増殖周期が同調しにくいため、ハイブリドーマ ($2n$) として生育することは難しいと考えている。

そこで、複合体の形成割合を huCRHR1 発現ミエローマ細胞と抗原を発現していないコントロールミエローマ細胞を用いて、上述と同様に複合体を形成後、共焦点レーザー顕微鏡で確認した。その結果をそれぞれの細胞数に基づき表 2-1、表 2-2 にまとめた。

表 2-1 ミエローマ細胞とB細胞との複合体形成の割合 (コントロール)

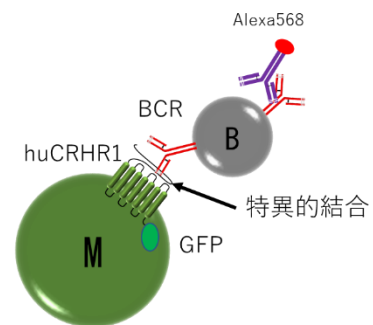
画像番号	感作B細胞	ミエローマ細胞	B細胞-ミエローマ細胞複合体
1	19	20	3
2	26	12	1
3	25	9	1
4	21	14	3
5	25	15	2
6	24	17	1
7	18	21	2
8	24	11	2
9	28	15	2
10	20	17	1
合計	230	151	18



感作B細胞1個あたりの複合体の割合：18/230=7.8%
 ミエローマ細胞1個あたりの複合体の割合：18/151=11.9%

表 2-2 huCRHR1発現ミエローマ細胞とB細胞との複合体形成の割合

画像番号	感作B細胞	huCRHR1発現ミエローマ細胞	B細胞-huCRHR1発現ミエローマ細胞複合体
8	24	5	2
10	16	5	2
11	20	5	1
12	18	2	0
13	21	3	1
14	36	6	2
15	54	8	2
16	32	4	2
17	32	3	2
18	13	2	1
合計	266	43	15



感作B細胞1個あたりの複合体の割合：15/266=5.6%
 huCRHR1発現ミエローマ細胞1個あたりの複合体の割合：15/43=34.9%

感作 B 細胞表面上には IgG タイプの B 細胞受容体 (BCR) が発現されているため、Alexa568 標識の抗マウス IgG (H+L) 抗体が結合した細胞を感作 B 細胞とした。感作 B 細胞との複合体の割合を huCRHR1 発現ミエローマ細胞とコントロールミエローマ細胞について比較したところ、コントロールミエローマ細胞では 11.9%であったのに対して、huCRHR1 発現ミエローマ細胞では 34.9%と比較的高い数値が得られた。2 種類の複合体を比較すると、huCRHR1 発現ミエロ

ーマ細胞では感作 B 細胞との複合体が約 3 倍、形成しやすいことが示された。この結果は、huCRHR1 発現ミエローマ細胞では、コントロールミエローマ細胞と比べて、huCRHR1 が特異的に発現されており、目的の感作 B 細胞の B 細胞受容体を介して、立体構造を保持した huCRHR1 が結合したと考えられる。このことから、SST 法の重要なポイントとなる B 細胞選択に抗原発現ミエローマ細胞が有用であることが示された。

B 細胞-ミエローマ細胞複合体を確認することができたため、SST 法に基づいて細胞融合を行った。本法で用いた電気パルス融合の特徴は、抗原抗体反応によって結合してお互いに膜を接する B 細胞-ミエローマ細胞のみを選択的に融合できるところにある [9]。その結果、多くのハイブリドーマを作製することに成功した。その結果を表 2-3 にまとめた。

表 2-3 立体構造認識モノクローナル抗体作製のまとめ

電気パルス (kV/cm)	ウェル数 (A)	ハイブリドーマ陽性数 (B)	Cell-ELISA 陽性数 (C)	ハイブリドーマ陽性率 (B) / (A) × 100 (%)	Cell-ELISA 陽性率 (C) / (B) × 100 (%)
2.0	576	91	40	15.8	44.0
2.25	96	9	3	9.4	33.9
2.5	768	220	68	28.6	30.9
3.0	96	7	2	7.3	28.6
合計	1,536	327	113	21.3	34.6

作製されたハイブリドーマを Cell-ELISA 法によって評価し、 ΔOD 値の値が 0.1 以上を Cell-ELISA 陽性とした。その割合は 2.0 kV/cm から 3.0 kV/cm のどのパルス条件においても 28.6 %以上の高い効率で作製された。電気パルスの条件が低いほど Cell-ELISA 陽性率は高い傾向にあった。ハイブリドーマ陽性率は 2.5 kV/cm の条件で最大であった。すべての条件をまとめると、ハイブリドーマ陽性率は 21.3 %となり、Cell-ELISA 陽性率は 34.6 %となった。このことから、SST 法は目的のモノクローナル抗体を高効率に作製できる革新的な方法である

可能性が示された。

作製されたハイブリドーマの中で高い抗体価が得られたものを限界希釈法によってクローン化を行った。最終的に、C7-E3、C7-G1、C7-H6 の 3 種類のクローン化ハイブリドーマを獲得した。3 種類のハイブリドーマ上清を Cell-ELISA 法によって評価した (図 2-14)。

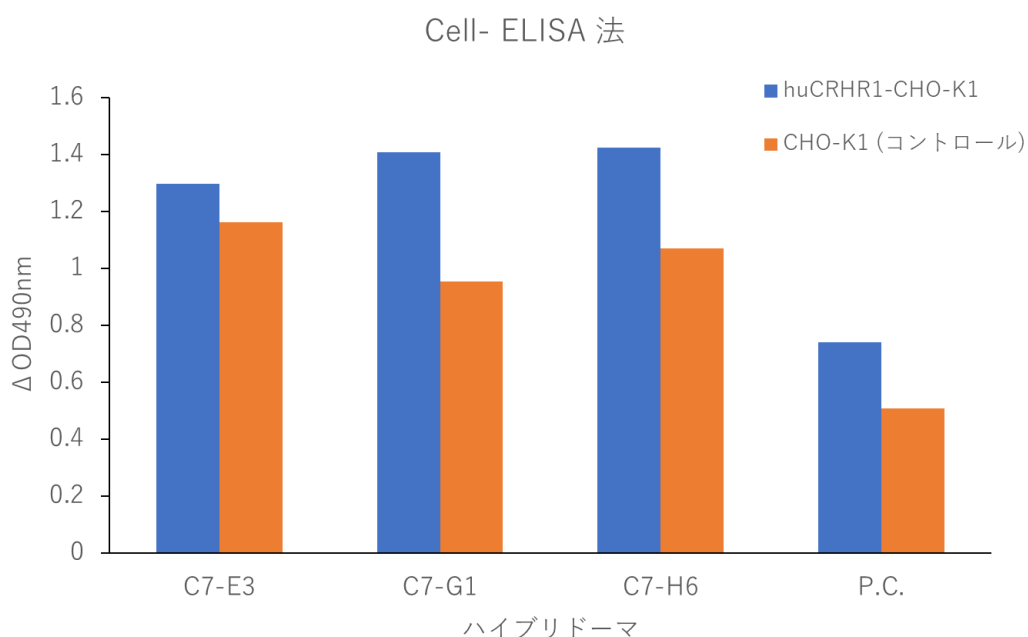


図 2-14 クローン化ハイブリドーマの上清中の抗体価

クローン化されたハイブリドーマ上清中のモノクローナル抗体は huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対して特異的に結合することが示された。これらの結果から、SST 法に基づき作製されたハイブリドーマは目的の抗体を産生することが示された。

ここで、コントロールの CHO-K1 細胞に対しても結合する結果が得られた。この理由については後述する (3.3.2 に記載)。

2.4 まとめ

本章では、立体構造特異的モノクローナル抗体の作製に取り組んだ。事前準備として、2種類の組換え細胞 huCRHR1 発現ミエローマ細胞および huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を作製した。作製された組換え細胞では、huCRHR1 の C 末端に付加された GFP の蛍光を指標として間接的ではあるが huCRHR1 の発現を確認できた。

SST 法の重要なポイントの 1 つである、B 細胞-ミエローマ細胞複合体形成についても検証した。コントロールミエローマ細胞と比較すると huCRHR1 発現ミエローマ細胞を使用した場合、約 3 倍の効率で B 細胞-ミエローマ細胞複合体を形成することが示唆された。

SST 法に基づき、細胞融合を実施した結果、多くのハイブリドーマを確認することができた。Cell-ELISA 陽性割合も 28.6 %以上と比較的高く、SST 法は有用なモノクローナル抗体の作製法であることが実証できた。

第3章 立体構造認識モノクローナル抗体の評価

3.1 目的

第2章において、SST法に基づき目的の抗体産生ハイブリドーマを多く作製することができた。このハイブリドーマから得られるモノクローナル抗体がどのような特徴を有しているかを様々な実験手法を用いて解析することを目的とした。

本章では、まず、SST法によって作製されたハイブリドーマ上清からモノクローナル抗体を精製した。その後、精製抗体を用いたCell-ELISA法によって、huCRHR1発現CHO-K1細胞との結合を評価した。また、ELISA法に基づきアイソタイプおよびサブクラスの決定も行った。さらに、huCRHR1への特異的結合をEphA2を膜上に発現するMDA-MB-231細胞を用いたCell-ELISA法によって検討した。

次に、作製されたモノクローナル抗体が立体構造特異的モノクローナル抗体であるかを検証した。huCRHR1発現CHO-K1細胞を用いた免疫蛍光染色法、ウェスタンブロッティング解析、4%パラホルムアルデヒド処理後のフローサイトメトリー解析、リガンド分子との競合アッセイ法に基づき評価した。さらに、昆虫細胞の発現系を用いてhuCRHR1を発現させた後、免疫蛍光染色によって、別の角度からの立体構造特異性の検証も行った。

3.2 材料および方法

3.2.1 材料

- AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG antibody, Fc_γ Fragment : Jackson ImmunoResearch
- AffiniPure Goat Anti-Mouse IgM antibody, μ Chain Specific : Jackson ImmunoResearch
- Alexa Fluor™ 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody : Invitrogen
- Alexa Fluor™ 568 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody : Invitrogen
- Anti-goat IgG (H+L chain) pAb-HRP : MBL
- Anti-mouse IgG (H+L chain) pAb-HRP : MBL
- Anti-human CRHR1 antibody (SAB2500272) : Sigma-Aldrich (Wb に使用)*
- Anti-human CRHR1 antibody (clone # 343919) : R&D Systems (Sf9 細胞に使用)*
- Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain : BIO-RAD
- CRH : ペプチド研究所
- Goat Anti-Mouse IgG H & L antibody Alexa Fluor® 647 (ab150115) : abcam
- HRP Color : BIO-RAD
- HiTrap™ MabSelect SuRe™ : GE Healthcare
- K5151-SUB-ISOTYPING KIT : コスモバイオ
- Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6x) for SDS-PAGE : ナカライテスク
- SuperSignal West Femto : Thermo
- Goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) : Jackson ImmunoResearch

- ・ *o*-phenylene diamine : 東京化成工業
- ・ パラホルムアルデヒド (PFA : paraformaldehyde) : 富士フイルム和光純薬(株)

* : huCRHR1 の一次構造認識

3.2.2 抗体の精製

クローン化ハイブリドーマの上清中のモノクローナル抗体は HiTrap™ MabSelect SuRe™ を用いて精製した。ハイブリドーマ上清 (40 mL) を 3,000 rpm (1,750 × g) で遠心後、上清を回収し、0.22 μm フィルターでろ過した。Binding buffer (20 mM sodium phosphate + 0.15 M NaCl, pH = 7.2) で 2 倍希釈してカラム精製のサンプルを調製した。カラムを平衡化するために、ミリ Q を 5 mL 流し、その後、Binding buffer 10 mL で平衡化した。サンプルを全量流し、その後、Binding buffer 10 mL で洗浄した。この時、Neutralization buffer (1 M Tris-HCl, pH = 9.0) をあらかじめ回収用チューブに 50 – 100 μL 加えておいた。その後、Elution buffer (0.1 M sodium citrate, pH = 3.0–3.6) を 5mL 流し、各フラクションを 150 – 200 μL ずつ回収用チューブに回収した。回収したサンプルは 280nm の吸光度を測定することで抗体濃度を測定した。 $\Delta OD_{280nm} = 1.0$ を約 725 μg/mL にて抗体濃度を換算した。

3.2.3 Cell-ELISA 法 (2.2.7 に準ずる)

300 - 350μl の huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells/mL) およびコントロール CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells/mL) を 96 穴プレートに播種し、37 °C、5% CO₂ 存在下で 2 日間培養した。各ウェルを PBS で洗浄した後、50 μL のハイブリドーマ上清または希釈したマウス血清を添加し、4 °C で 2 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、1 / 10,000 倍希釈した goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) を二次抗体として添加し、4 °C で 1 時間インキュベートした。各ウェルを PBS で少なくとも 5 回洗浄し、発色試薬 [0.1 M sodium citrate buffer (pH = 5.2) + *o*-phenylene diamine (1 mg/ml) + 0.02% H₂O₂] を 50 μL / ウェル加え 37 °C で 10-20 分間インキュベートし、1 M H₂SO₄ を 50 μl / ウェル加え反応を止め、490nm で吸光度を測定した。

3.2.4 ELISA 法 (アイソタイプの決定)

抗原として AffiniPure Goat Anti-Mouse IgM antibody, μ Chain Specific (2.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) および AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG antibody, Fc γ Fragment (2.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を使用した。抗原を 0.1 M NaHCO₃ (pH = 9.8) で 240 倍希釈 (10 ng/ μL) した後、96 穴プレートに 50 μL ずつ添加し、4 °C で一晩インキュベートし、抗原をプレートに吸着させた。翌日、96 穴プレートを PBS で 3 回洗浄し、350 μL の 1% ゼラチン (1% ゼラチン in PBS) を添加し、37 °C で 2 時間以上静置することで、ブロッキングを行った。PBST (PBS + 0.05% Triton-X) で 3 回洗浄し、50 μL の精製抗体もしくはマウス希釈血清を添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄した後、PBST で 1 / 10,000 倍に希釈した 2 次抗体 [goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase)] を 50 μL 添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。PBST で 5 回以上洗浄した後、100 μL の発色剤 [0.1 M sodium citrate buffer (pH = 5.2) + *o*-phenylene diamine (1 mg/ml) + 0.02% H₂O₂] を添加し、37 °C で 10 分間インキュベートして発色させ、50 μL の 1 M H₂SO₄ を添加し、反応を停止し、490 nm で吸光度を測定した。

3.2.5 ELISA 法 (サブクラスの決定)

精製モノクローナル抗体のサブクラス (IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3) の決定は K5151-SUB-ISOTYPING KIT に基づき、プロトコールを少し改変して ELISA 法を実施した。マウス抗体を結合できる Goat anti-Mouse Immunoglobulins antibody を 0.1 M NaHCO₃ (pH = 9.8) で 100 倍希釈し、96 穴プレートに 100 μL / ウェルで添加し、4 °C で一晩静置した。PBS で 1 回洗浄後、1% ゼラチン (1% ゼラチン in PBS) を添加し上述の 3.2.4 に従いブロッキングを行った。PBST で 3 回洗浄後、精製抗体もしくはマウス希釈血清を 50 μL / ウェル添加し、1 時間反応させ

た。PBST で 3 回洗浄後、各サブクラス抗体を 50 μ L / ウェル添加し、1 時間反応させた。PBST で 3 回洗浄後、1/4,000 倍希釈した Goat anti-Rabbit IgG antibody - Peroxidase を 100 μ L / ウェル添加し、1 時間反応させた。最後に PBST で 5 回洗浄後、発色試薬 [0.1 M sodium citrate buffer (pH = 5.2) + *o*-phenylene diamine (1 mg/ml) + 0.02% H₂O₂] を 100 μ L / ウェル加え、37°C、10-20 分間インキュベートし 1M H₂SO₄ を 50 μ l / ウェル加え反応を止め、OD490nm で吸光度を測定した。

3.2.6 SDS-PAGE およびウェスタンブロットティング法

(精製モノクローナル抗体の純度検定)

精製抗体を Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6x) for SDS-PAGE と混合し、煮沸することによって還元サンプルを調製した。14% アクリルアミドゲルに分子量マーカーおよびサンプルを添加し、ゲル 1 枚当たり 30 V の電圧で 60 分間通電することで電気泳動した [53]。ゲルを洗浄した後、分子量に基づき泳電されたタンパク質を Bio-Safe™ Coomassie G-250 Stain によって染色した。

ウェスタンブロットティング法では、SDS-PAGE 後のゲルを 20 V の電圧で 90 分間通電し、ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。転写後、0.1% スキムミルクによってブロッキングを行った。その後、1/5,000 倍希釈した goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) を反応させた。発色試薬 HRP Color を PVDF 膜に加え、遮光して室温で 5 分間インキュベートを行った。その後、バンドの発色を Image Capture G3 で撮影した。

3.2.7 Cell-ELISA 法によるモノクローナル抗体の特異性の検証

Cell-ELISA 法に基づき、モノクローナル抗体の目的抗原に対する特異性を検証した。抗原となる細胞として huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞と MDA-MB-231 細胞を使用した。MDA-MB-231 細胞はヒト乳腺癌細胞で EphA2 を過剰発現してい

ることが知られている [54]。300 μL –350 μL の huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells/mL) および MDA-MB-231 細胞 (1.0×10^5 cells/mL) を 96 穴プレートに播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 存在下で 2 日間、培養した。各ウェルを PBS で洗浄し、各濃度に希釈した精製モノクローナル抗体を添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、1/10,000 倍希釈した goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) を二次抗体として使用し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。各ウェルを PBS で少なくとも 5 回洗浄した後、発色試薬 [0.1 M sodium citrate buffer (pH = 5.2) + *o*-phenylene diamine (1 mg/ml) + 0.02% H_2O_2] を 50 μL /ウェル加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、10-20 分間インキュベートし、1M H_2SO_4 を 50 μL /well 加え反応を止め、490nm で吸光度を測定した。

3.2.8 免疫蛍光染色法

huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を 130 \times g、5 分間遠心分離し、PBS で洗浄した。一次抗体としてクローン化ハイブリドーマ上清 (図 3-9 のみに使用)、1/100 倍希釈した精製モノクローナル抗体 (1.4 μg /mL) または 1/200 倍希釈したマウス血清を 1 mL 加え懸濁後、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間、ローテーションした。130 \times g、5 分間で遠心分離し、PBS で 2 回洗浄後、二次抗体として 1/1,000 倍希釈した Alexa FluorTM 568 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody を 1 mL 加え、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間、ローテーションした。130 \times g、5 分間で遠心分離し PBS で 2 回洗浄後、再度、適量 (0.5–1.0 mL) の PBS で懸濁し共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を観察した。

3.2.9 精製モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティング法

(精製モノクローナル抗体の立体構造特異性検定)

1 レーン当たり huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞 (1.0×10^7 cells/mL) 10 μL に対

して Sample Buffer Solution with Reducing Reagent (6x) for SDS-PAGE を 2 μ L を添加し、5 分間、煮沸することで還元サンプルを作製した。サンプルを 14% アクリルアミドゲルに添加し、前述の 3.2.6 と同様に電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した。転写された PVDF 膜は 0.1% スキムミルクでブロッキングした。ブロッキングされた PVDF 膜をレーンごとに切り取り、1 / 100 倍希釈した精製モノクローナル抗体もしくは 1/1,000 倍希釈した Anti-human CRHR1 antibody (SAB2500272) (一次構造認識) を 1 mL 添加し 1 時間、振盪することによって抗原抗体反応に基づき一次抗体を反応させた。PBST で洗浄後、二次抗体として 1 / 5,000 倍希釈した Anti-mouse IgG (H+L chain) pAb-HRP もしくは Anti-goat IgG (H+L chain) pAb-HRP を 1 mL 添加し、1 時間、振盪することによって反応させた。前者は精製モノクローナル抗体に対して使用し、後者は一次構造認識の Anti-human CRHR1 antibody (SAB2500272) に対して用いた。化学発光試薬 (SuperSignal West Femto) の Luminol/Enhancer Solution と Stable Peroxide Solution を等量混ぜ PVDF 膜に加え、遮光して室温で 5 分間インキュベートを行った。その後、発光を Image Capture G3 で撮影した。

3.2.10 4% パラホルムアルデヒドを用いた免疫蛍光染色法とフローサイトメトリー解析

1 mL の PBS に懸濁した huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞 (1.0×10^6 cells) に対して 4% パラホルムアルデヒド (最終濃度) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間ローテーションした。PBS で洗浄後、1 / 100 倍希釈した精製モノクローナル抗体もしくは 1 / 200 倍希釈したマウス血清を加え、4 $^{\circ}$ C で 1 時間ローテーションした。PBS で洗浄後、1 / 1,000 倍希釈した Alexa FluorTM 568 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody (免疫蛍光染色法に使用) もしくは 1 / 2,000 倍希釈した Goat Anti-Mouse IgG H & L antibody Alexa Fluor[®] 647 (ab150115) (フローサイトメトリ

一解析に使用) を加え、4 °C で1時間ローテーションした。PBS で洗浄後、免疫蛍光染色法においては共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を確認した。フローサイトメトリー解析では BD FACSCanto II にて Alexa 647 の蛍光をカウントし、解析した。

3.2.11 組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞を用いた免疫蛍光染色法

10 mL の Sf9 細胞懸濁液に 0.1 mL の huCRHR1-RFP 組換えバキュロウイルス (MOI: 0.1-1.0) を加え、27 °C で3-4日間インキュベートすることで、Sf9 細胞に組換えバキュロウイルスを感染させた。その後、バキュロウイルス感染 Sf9 細胞を遠心にて集め、PBS で洗浄後、1/100 倍希釈した精製モノクローナル抗体、1 / 200 倍希釈したマウス血清または、1 / 1,000 希釈した Anti-human CRHR1 antibody (clone # 343919) (一次構造認識) を加え、4 °C で1時間ローテーションした。PBS で洗浄後、1 / 1,000 倍希釈した Alexa Fluor™ 488 F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L) antibody を加え、4 °C で1時間ローテーションした。PBS で洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡で蛍光を確認した。

3.2.12 リガンド分子 CRH を用いた競合アッセイ

300 - 350µl の huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells / mL) および同量のコントロール CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells / mL) を 96 穴プレートに播種し、37 °C、5% CO₂ 存在下で2日間、培養した。PBS で洗浄後、コルチコトロピン放出ホルモン (CRH) を最終濃度 0 - 10 µM になるように添加し、37 °C で2時間インキュベートした。PBS で洗浄後、50 ng / mL に希釈した精製モノクローナル抗体を添加し、4 °C で1時間インキュベートした。PBS で3回洗浄した後、1 / 10,000 倍希釈した goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) を二次抗体として使用し、4 °C で1時間インキュベートした。各ウ

エルを PBS で少なくとも 5 回洗浄し、発色試薬 [0.1 M sodium citrate buffer (pH = 5.2) + *o*-phenylene diamine (1 mg / ml) + 0.02% H₂O₂] を 50 μL / ウェル加え、37 °C、10-20 分間インキュベートした後、1M H₂SO₄ を 50 μl/well 加え反応を止め、490nm で吸光度を測定した。

3.3 結果および考察

3.3.1 立体構造特異的モノクローナル抗体の精製

SST 法に基づき多くの抗体産生ハイブリドーマを獲得することができた。そこで、限界希釈法によってクローン化した 3 種類の抗体産生ハイブリドーマ上清 (C7-E3、C7-G1、C7-H6) をアフィニティーカラムを用いて精製した。このカラムの特徴は抗体の Fc 部分 (図 1-1-2 参照) と特異的に結合するプロテイン A が充填されている。その概略を図 3-1 に示す。

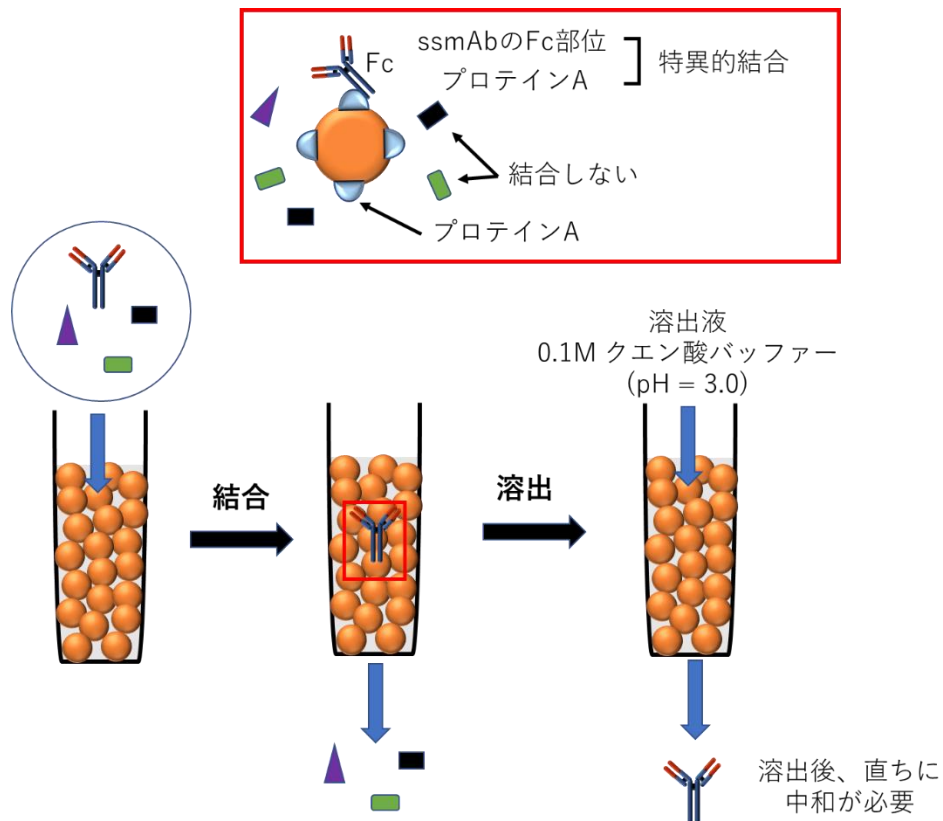


図 3-1 モノクローナル抗体の精製

ハイブリドーマ上清サンプル中には抗体以外の多くの夾雑物が含まれているが、サンプル中の抗体の Fc 部分がプロテイン A と特異的に結合することによって、抗体のみをカラム内にトラップできる [55]。未吸着の夾雑物を除くためにカラムを洗浄した後、pH=3.0 のクエン酸バッファーを用いることによって、抗

体の Fc 部分とプロテイン A との結合を弱め、溶出した。その時、重要なことは、中和することで精製モノクローナル抗体の変性を防ぐことである。ここでは、クローン C7-E3 に着目し、結果を報告する。各フラクションの抗体濃度を 280nm の吸光度から算出した (図 3-2) 。具体的には $\Delta OD_{280nm} = 1.0$ を抗体濃度を約 725 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で換算した。

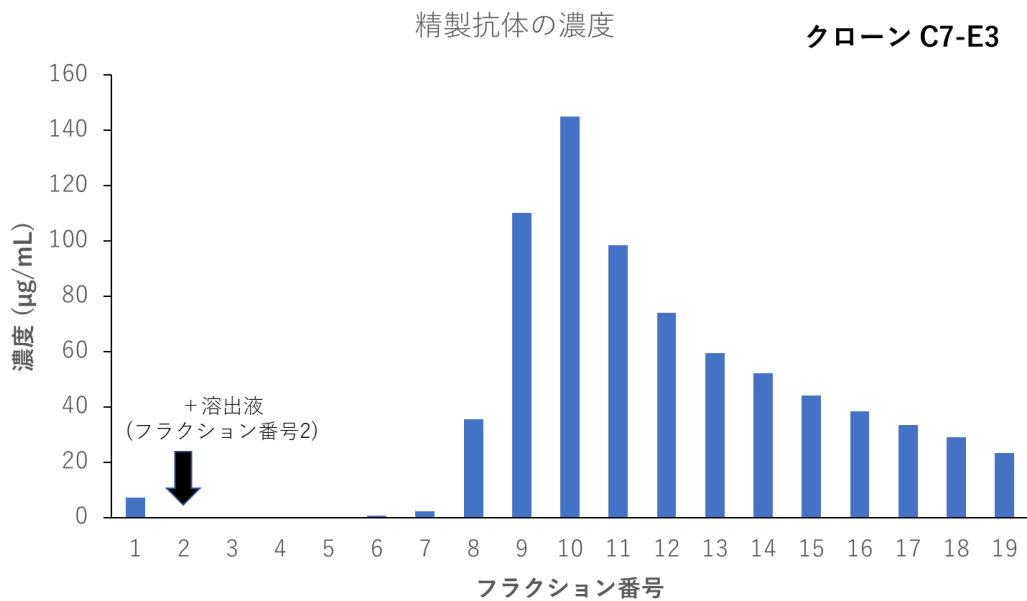


図 3-2 精製モノクローナル抗体のタンパク質濃度

フラクション番号 2 から 7 では、抗体の溶出が認められなかったが、フラクション番号 8 以降では確認され、フラクション番号 10 をピークに抗体量が減少した。さらに、各フラクションを用いて Cell-ELISA 法によって抗体価を測定した (図 3-3) 。

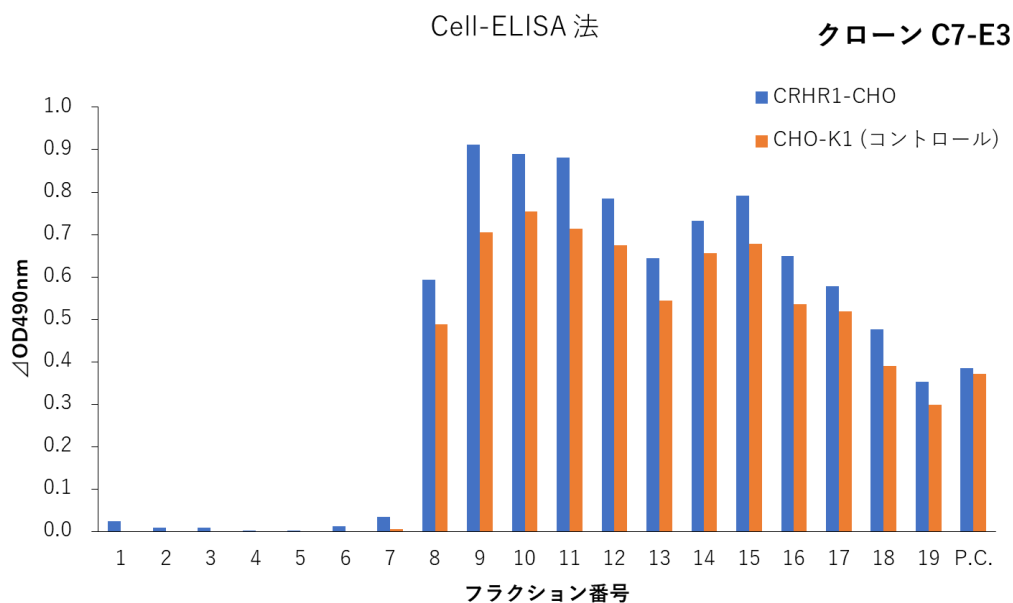


図 3-3 精製モノクローナル抗体の抗体価

抗体濃度の増加に伴い、抗体価を確認することができた。これらの結果から、プロテイン A カラムを用いたアフィニティーカラムによるモノクローナル抗体の精製に成功した。同様に、C7-G1、C7-H6 のハイブリドーマ上清についてもプロテイン A カラムを用いて精製した。その結果を表 3-1 にまとめた。すべてのモノクローナル抗体で約 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で精製できた。

表 3-1 精製モノクローナル抗体濃度のまとめ

クローン名	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
C7-E3	137.0
C7-G1	144.9
C7-H6	139.9

3.3.2 精製モノクローナル抗体の特徴

3 種類のモノクローナル抗体 (C7-E3、C7-G1、C7-H6) について、Cell-ELISA 法および ELISA 法を用いて、抗体価とアイソタイプおよびサブクラスの決定を行った。Cell-ELISA 法の結果を図 3-4 に示した。

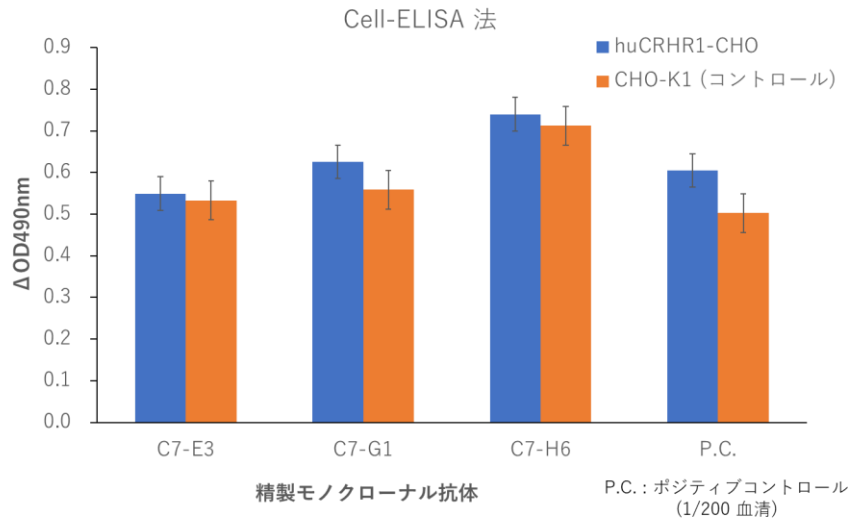


図 3-4 精製モノクローナル抗体の抗体価

3 種類のモノクローナル抗体は huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対して結合を示した。しかし、前述のクローン化ハイブリドーマ上清中での抗体価と同様 (図 2-14) にコントロール細胞の CHO-K1 細胞においても、結合が確認された。CHO-K1 細胞上にはチャイニーズハムスター由来の CRHR1 が発現していることが報告されており [56]、作製されたモノクローナル抗体はヒトおよびチャイニーズハムスター由来の CRHR1 の共通の立体構造エピトープを認識している可能性が示唆された。

次に、ELISA 法におけるアイソタイプの決定を図 3-5 に示した。

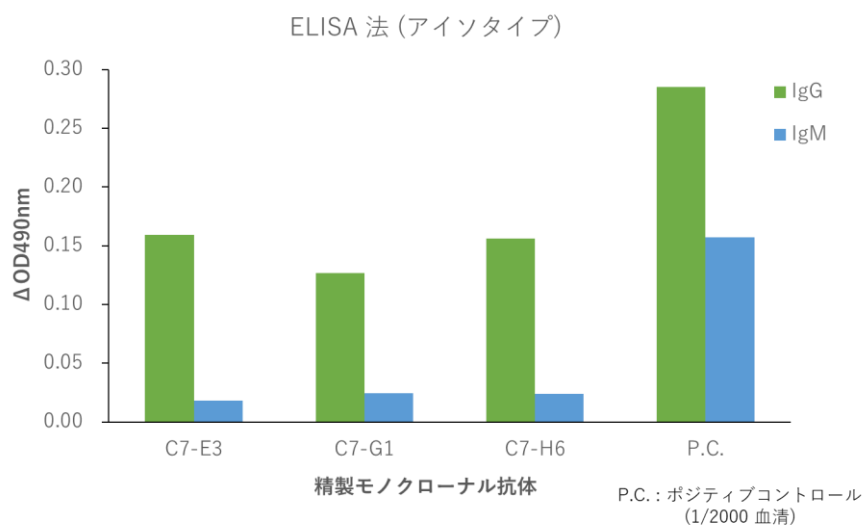


図3-5 精製モノクローナル抗体のアイソタイプの決定

すべてのモノクローナル抗体が IgG タイプであることが示された。分子標的治療薬としてモノクローナル抗体を使用する場合、IgG タイプであることが望ましいとされている [57]。IgG タイプのモノクローナル抗体は抗体薬物複合体の製剤に適している [58]。

さらなる評価のために、サブクラスも行った (図 3-6)。

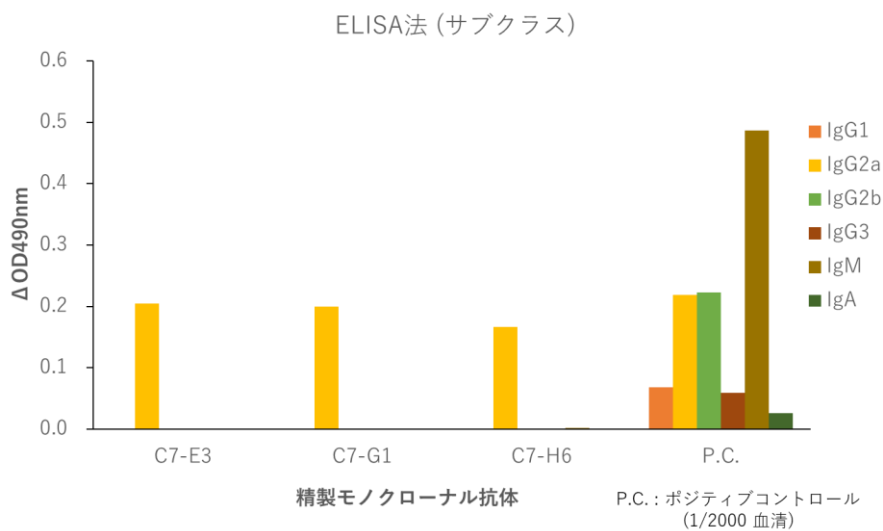


図 3-6 精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定

この結果から、3 種類のモノクローナル抗体は IgG2a タイプであることが判明した。したがって、SST 法によって IgG2a タイプのモノクローナル抗体を作製

できることが実証された。IgG タイプのサブクラスのうち、IgG2a および IgG2b タイプのサブクラスは、一般的に、エフェクター応答を活性化するために最も強力であり、抗ウイルス免疫および自己免疫疾患に対して有用であると考えられている [59]。

さらに、3 種類のモノクローナル抗体を SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング (Wb) 解析によって評価した (図 3-7)。

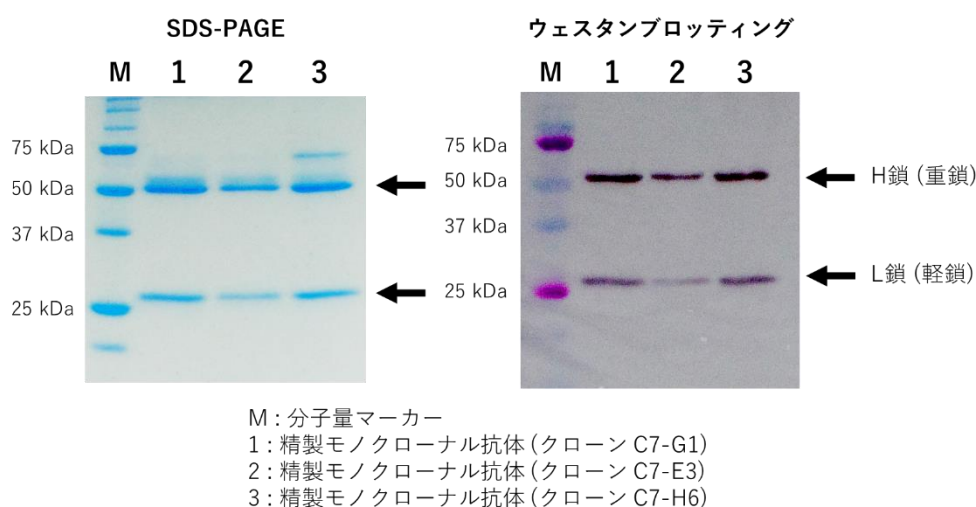


図 3-7 SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング (Wb) を用いた精製モノクローナル抗体の解析

2 種類の実験において、50 kDa および 25 kDa 付近にバンドを確認することができた。モノクローナル抗体は重鎖と軽鎖を 2 本ずつもつポリペプチド鎖であり (図 1-1-2 参照)、それぞれ、50 kDa と 25 kDa の分子量を有している。さらに、Wb 解析では、精製モノクローナル抗体が抗マウス IgG (H + L) 抗体と特異的に結合することが示された。したがって、確認されたバンドはそれぞれ、マウス由来抗体の重鎖および軽鎖であり、純度が高い精製モノクローナル抗体が取得できた。

次に、精製モノクローナル抗体の特異性を huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞とヒト乳腺癌細胞である MDA-MB-231 細胞を用いた Cell-ELISA 法によって評価した (図 3-8)。

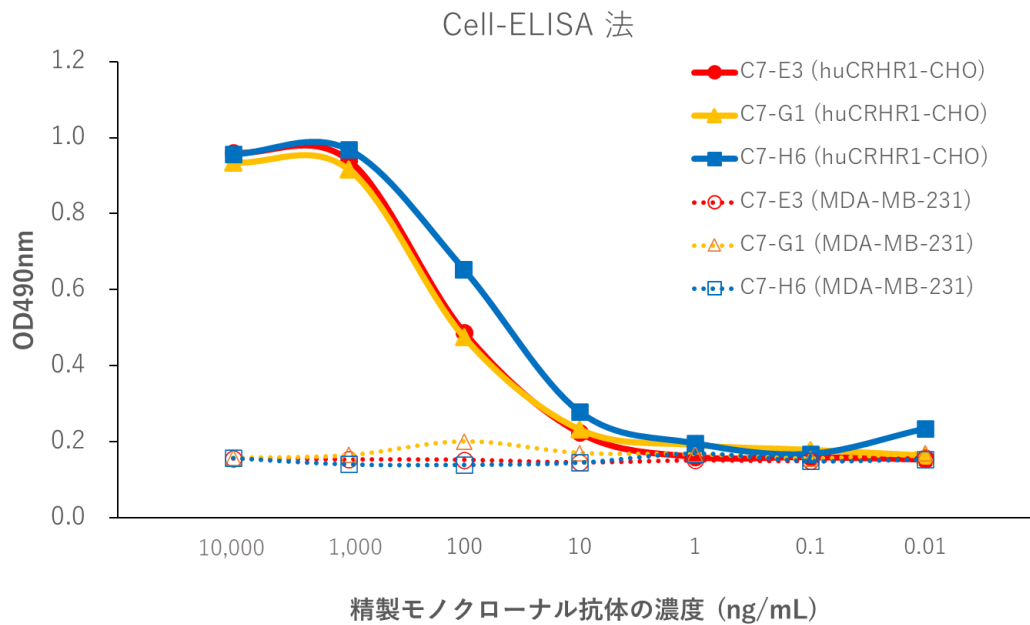


図 3-8 Cell-ELISA 法を用いた精製モノクローナル抗体の特異性の検証

3 種類の精製モノクローナル抗体は、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対して抗体濃度依存的に特異的な結合が認められた。一方、EphA2 を膜表面に発現している MDA-MB-231 細胞に対しては特異的な結合を認めることができなかった。この結果から、精製モノクローナル抗体は huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞表面上に発現されている huCRHR1 に対して特異的に結合していることが明らかになった。

3.3.3 免疫蛍光染色法に基づく精製モノクローナル抗体の評価

精製モノクローナル抗体 (ssmAb) は huCRHR1 に対して特異的に結合することが示された。そこで、モノクローナル抗体が細胞膜上のインタクトな huCRHR1 の立体構造を特異的に認識しているかを様々な実験にて評価した。

最初に、免疫蛍光染色法によって検討した。その結果、3種類のモノクローナル抗体は huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞の細胞表面に特異的に結合していることが示された (図 3-9)。

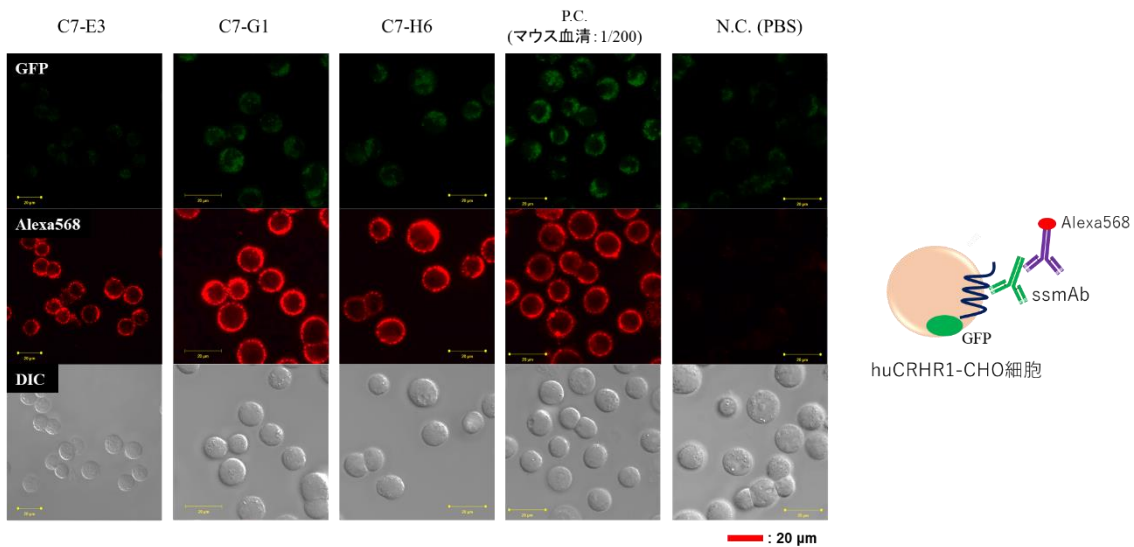
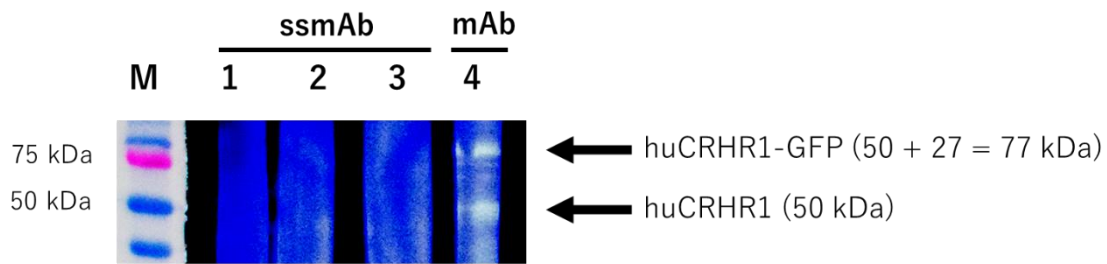


図 3-9 クローン化ハイブリドーマ上清のモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色法

ポジティブコントロール (P.C.) のマウス血清と同様な Alexa 568 の蛍光を細胞表面上で確認できた。CHO-K1 細胞上で発現されている huCRHR1 は本来の高次構造を保持していることから、作製されたモノクローナル抗体は huCRHR1 の立体構造を特異的に認識していることが示された。

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解析では、精製モノクローナル抗体の特異的な結合を認めることができなかった (レーン 1-3) (図 3-10)。



huCRHR1発現CHO細胞： 1.0×10^5 cells
 一次抗体：抗CRHR1抗体
 二次抗体：HRP標識抗マウス抗体
 または
 HRP標識抗ヤギ抗体

M: マーカー
 1: C7-G1 (立体構造特異的 mAb ; ssmAb)
 2: C7-E3 (立体構造特異的 mAb ; ssmAb)
 3: C7-H6 (立体構造特異的 mAb ; ssmAb)
 4: 抗CRHR1抗体 (一次構造認識 mAb)

図 3-10 精製モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロットティング解析

対照的に、一次構造認識抗体である抗 CRHR1 抗体 (SAB2500272) では、huCRHR1 に対する結合を確認できた (レーン 4)。このことから、精製モノクローナル抗体は変性 huCRHR1 に対して結合できないことが証明された。

さらに、4% パラホルムアルデヒド (PFA) 処理後の huCRHR1 発現 CHO 細胞を用いて、免疫蛍光染色法およびフローサイトメトリー解析を行った。パラホルムアルデヒドは、一般的に化学固定試薬として使用されており、すべての細胞に適用可能で、幅広く利用されている。細胞の固定化は、タンパク質の第一級アミンとの反応によるメチレン架橋によって引き起こされる [60, 61]。メチレン架橋によって、タンパク質の本来の高次構造が部分的に変化を受ける。その結果、4% パラホルムアルデヒドを作用させた後、すべての精製モノクローナル抗体において Alexa568 蛍光が減少し、特異的な結合が阻害された (図 3-11)。

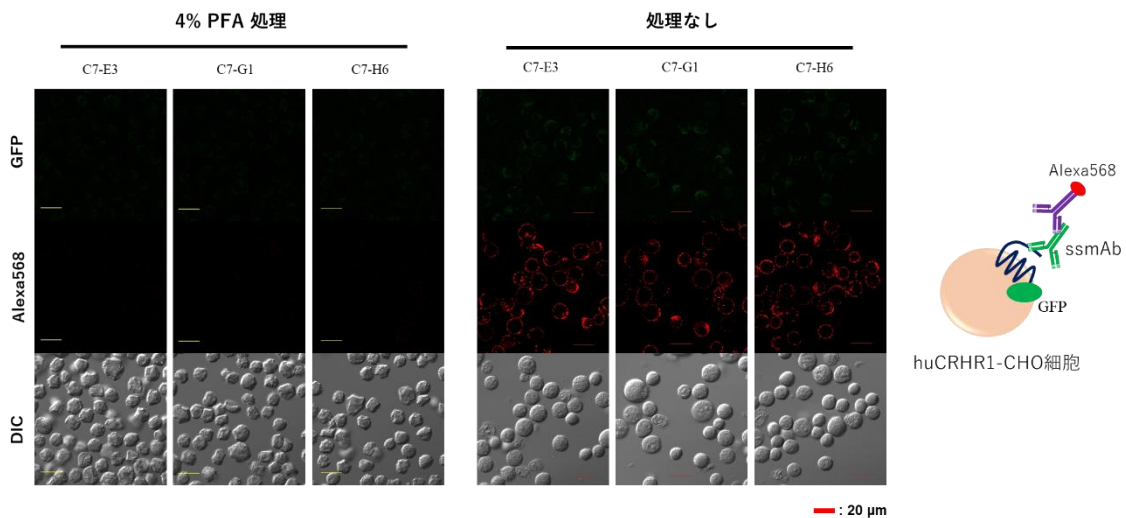


図 3-11 精製モノクローナル抗体を用いた4%パラホルムアルデヒド処理後の免疫蛍光染色法

一方、4% パラホルムアルデヒドで処理をされていないコントロール細胞 (huCRHR1-CHO 細胞) では、前述の結果 (図 3-9) と同様に、Alexa 568 の蛍光が確認できた。4% パラホルムアルデヒドを作用させた場合、わずかではあるが、細胞の形が歪になっていることが認められた。このことは、パラホルムアルデヒドの作用によって、細胞膜表面の構造が変化し、不安定化したと考えられる。さらに、4% パラホルムアルデヒドの処理の有無によって、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対する精製モノクローナル抗体の結合をフローサイトメトリーによって解析した。その結果、3 種類の精製モノクローナル抗体において、4% パラホルムアルデヒドを作用させた後、蛍光強度のピークが左にシフトしていることが確認され、蛍光強度の低下が明らかになった (図 3-12)。

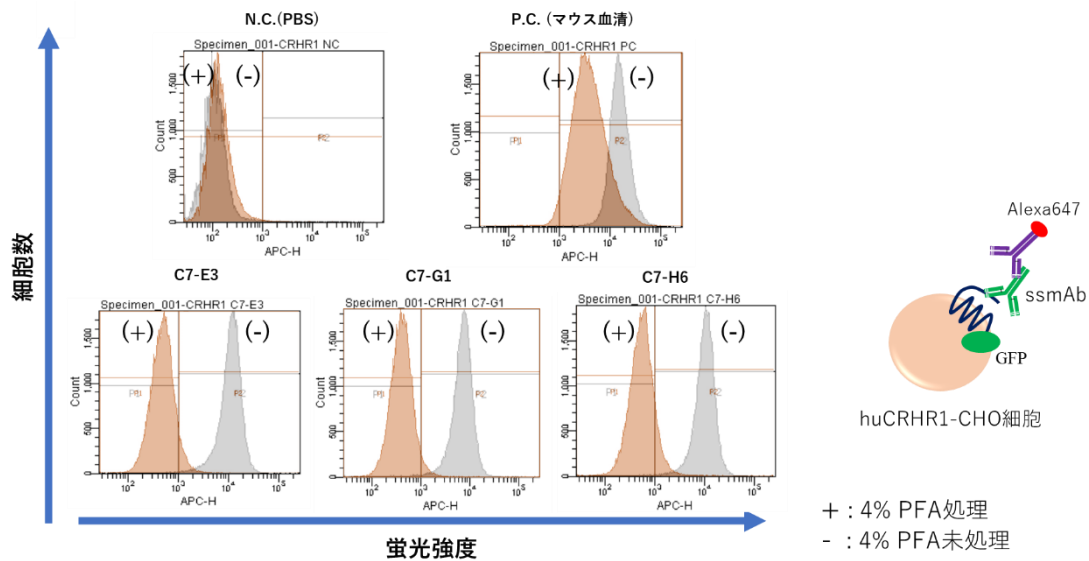


図 3-12 精製モノクローナル抗体を用いた4%パラホルムアルデヒド処理後のフローサイトメトリー解析

これら結果から、4% パラホルムアルデヒドで処理した場合、部分変性した huCRHR1 に対する精製モノクローナル抗体の親和性が低下することが示された。

したがって、SST 法に基づき作製された立体構造特異的モノクローナル抗体 (ssmAb) は、huCRHR1 の本来の高次構造を特異的に認識していることが実証された。SST 法は、複雑な構造を持つ 7 回膜貫通型 GPCR においても、立体構造特異的モノクローナル抗体の高効率かつ選択的作製を特徴とする、非常に有望な新技術に成り得ると考えられる。

3.3.4 バキュロウイルスを用いた精製モノクローナル抗体の評価

これまで、哺乳動物由来の huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を中心に精製モノクローナル抗体の評価を行った。ここでは、昆虫細胞に着目して精製モノクローナル抗体の作用を評価した。

バキュロウイルスは昆虫由来の Sf9 細胞を宿主として、高効率に目的のタンパク質を発現することができる [62]。本研究では、前任者によって調製された huCRHR1-RFP 発現組換えバキュロウイルスを使用した [63]。具体的には、目的遺伝子を含む組換えトランスファーベクターと AcNPV 由来の BaculoGold Linearized DNA を Sf9 細胞に対してコトランスフェクションを行った。その後、2 回感染を繰り返し、組換えバキュロウイルスを調製した。huCRHR1-RFP 発現組換えバキュロウイルスを Sf9 細胞に感染させ、組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞を作製した。Sf9 細胞にバキュロウイルスが感染すると、細胞内で目的タンパク質が多く発現され、GPCR のような膜タンパク質の場合、本来の膜表面に発現される。そのため、組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞表面上には huCRHR1-RFP が立体構造を保持した状態で発現されると考えられる。この組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞を使用して、免疫蛍光染色法に基づき精製モノクローナル抗体を評価した (図 3-13)。

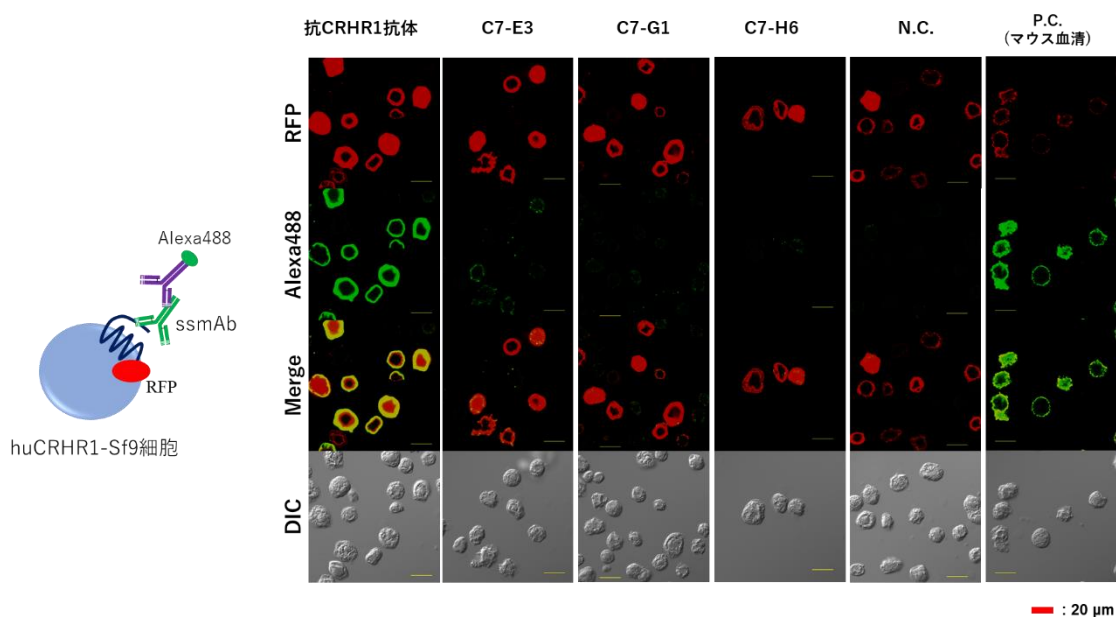


図 3-13 Sf9細胞を用いた免疫蛍光染色法

その結果、一次構造認識の抗 huCRHR1 抗体 (clone # 343919) および本研究において得られたマウス血清中のポリクローナル抗体は、Sf9 細胞表面の huCRHR1 との結合を示した。一方、C7-E3 抗体は Sf9 細胞表面に発現した huCRHR1 とわずかに結合したが、C7-G1 抗体と C7-H6 抗体のいずれも huCRHR1 発現 Sf9 細胞への特異的結合を認めることができなかった。

Sf9 細胞における免疫蛍光染色法の結果は、少なくとも 2 つの理由が考えられる。1 つは、組換えバキュロウイルス発現システムによって、Sf9 細胞の生存率の低下を引き起こすことが多いため、バキュロウイルス感染 Sf9 細胞で発現した huCRHR1 が部分的に変性していた可能性がある。別の可能性としては、昆虫細胞の糖鎖の構造が哺乳動物細胞で発現されるものとは異なることが考えられる。哺乳動物細胞と昆虫細胞は、グリコシル化システムに関して異なることが一般的に知られている。哺乳動物細胞では、シアル酸が糖鎖末端に結合した複雑な糖鎖構造が形成されている。一方、昆虫細胞では、独自の経路でポーシマンノース (paucimannose) 型糖鎖が形成される [64]。したがって、糖鎖を含む huCRHR1 の構造は、哺乳動物細胞と昆虫細胞の間で異なる構造を有し、huCRHR1 の立体

構造に影響を与えている可能性がある。

ここで、C7-E3 抗体は Sf9 細胞に発現した huCRHR1 に対してわずかに結合していたことについて考察した。一次構造認識 huCRHR1 抗体やマウス血清と比較すると蛍光強度が低かった。このことから、哺乳動物細胞において発現された huCRHR1 よりも昆虫細胞において発現された huCRHR1 では抗体の親和性の低下が示唆された。この結果は、哺乳動物細胞と昆虫細胞間における huCRHR1 の高次構造形成に必須となる折りたたみ過程の違い (アミノ酸の空間的配座) に起因する可能性も考えられる。Sf9 細胞において、CRHR1 は発現していないことから、SST 法によって作製されたモノクローナル抗体は目的抗原に対して特異的に結合している可能性がこの実験からも示唆された。

3.3.5 huCRHR1 のリガンド分子 CRH との競合アッセイ

本研究の標的抗原 huCRHR1 は CRH をリガンド分子としており、その結合によって細胞内にシグナルを伝える [65-67]。作製されたモノクローナル抗体がリガンド分子と同じ部位に結合できるかを確認するために、競合アッセイによって検証した (図 3-17-1)。

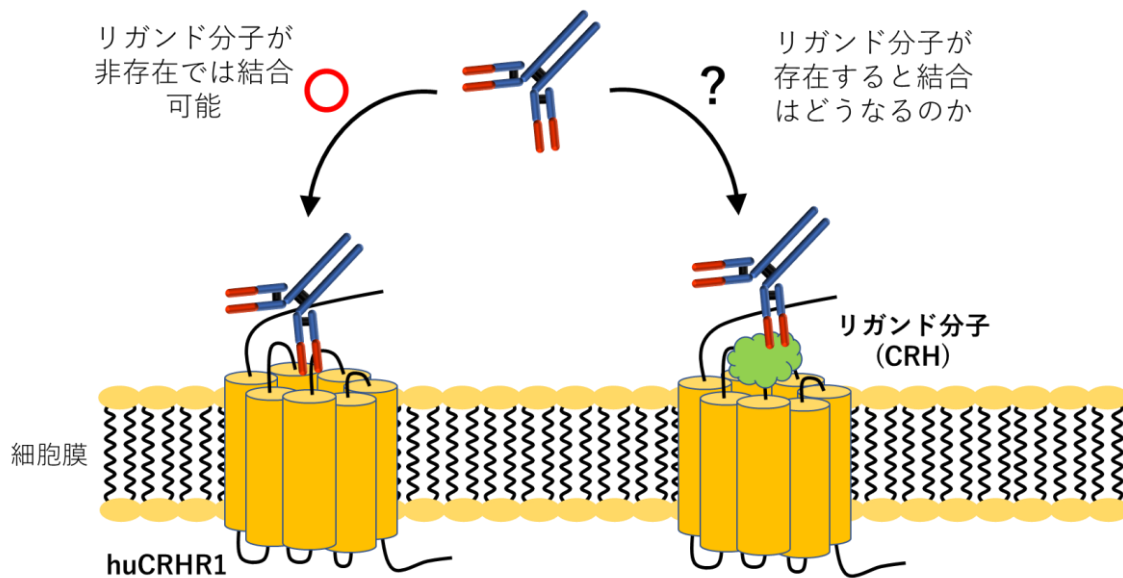


図 3-17-1 精製モノクローナル抗体とリガンド分子CRFとの競合アッセイ

huCRHR1 と CRH のそれぞれの結合サイトは、huCRHR1 ではアミノ酸残基 42-105、CRH ではアミノ酸残基 27-38 に存在していると報告されている [65, 68]。競合アッセイ法に基づき検討した結果、huCRHR1 へのモノクローナル抗体 (C7-H6) の特異的結合は、CRH 濃度にかかわらず同程度に維持されるか、もしくは、CRH 濃度の増加に伴いわずかに結合が促進された (図 3-17-2)。

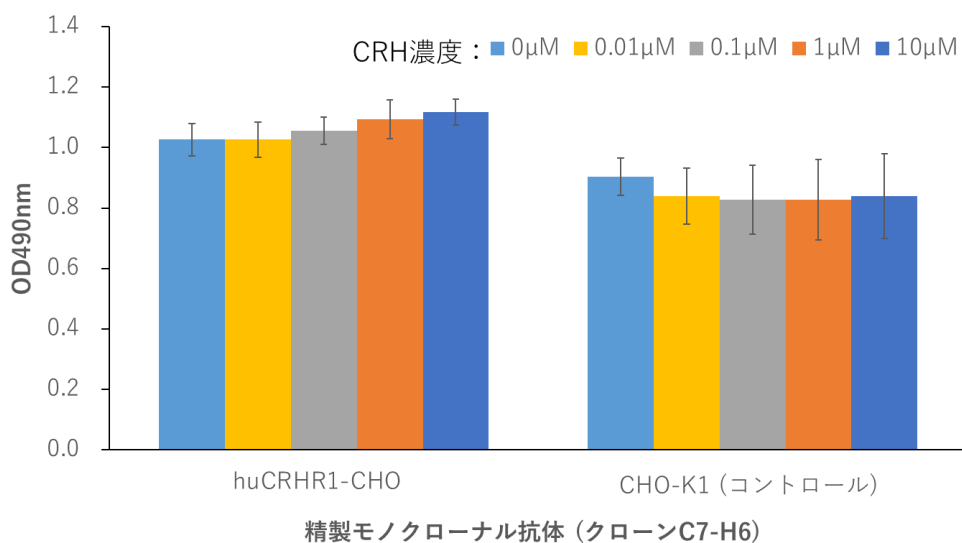


図 3-17-2 精製モノクローナル抗体とリガンド分子CRFとの競合アッセイ

この結果は、立体構造特異的モノクローナル抗体は、CRH と同じ結合部位ではない可能性を意味している。むしろ、リガンド (CRH) と受容体 (huCRHR1) 複合体の形成が huCRHR1 の立体構造認識を安定化させることによって、立体特異的モノクローナル抗体の結合がわずかに増加したと推測される。したがって、作製されたモノクローナル抗体は huCRHR1 に特異的に結合している可能性がより強固になったと考えている。

3.4 まとめ

本章では、SST 法によって作製された抗体産生ハイブリドーマ上清から精製モノクローナル抗体を調製し、その評価を行った。

プロテイン A カラムを使用した抗体精製では、3 種類の精製モノクローナル抗体 (C7-E3、C7-G1、C7-H6) を取得することに成功した。各抗体は SDS-PAGE およびウェスタンブロッティング法によって、純度が高い精製モノクローナル抗体であることが確認できた。さらに、huCRHR1 または EphA2 を膜表面上に発現する細胞を用いて、Cell-ELISA 法に基づき検討した結果、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞への特異的結合が証明された。また、ELISA 法を用いて IgG2a サブクラスを決定した。すべての精製モノクローナル抗体は約 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で精製できた。

精製モノクローナル抗体の立体構造認識に関して huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を用いて様々な評価を行った。免疫蛍光染色法を用いた可視化解析によって、精製モノクローナル抗体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 細胞を完全に変性させたウェスタンブロッティング法においては、精製モノクローナル抗体との特異的な結合を認めることができなかった。さらに、4% パラホルムアルデヒド処理によって細胞表面上のタンパク質を部分変性した場合、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対する精製モノクローナル抗体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の 2 種類の方法によって明らかになった。これらの結果から、精製モノクローナル抗体は 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 に対して親和性が低下することが示された。

組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞を用いた免疫蛍光染色において、精製モノクローナル抗体 C7-E3 がわずかな結合を示したが、C7-G1、C7-H6 由来の精製モノクローナル抗体においては特異的結合を確認できなかった。この結果は、

昆虫細胞と哺乳動物細胞によって発現される糖鎖構造のわずかな違いが両細胞間で異なり、精製モノクローナル抗体がそのわずかな構造の差異を認識している可能性が示唆された。

精製モノクローナル抗体のリガンド分子との競合アッセイを行った結果、CRH の添加量が増えるにつれて、わずかではあるが、精製モノクローナル抗体の結合量も増加した。これによって、精製モノクローナル抗体の認識部位と CRH の認識部位は異なることが示された。

本章の結果をまとめると、精製モノクローナル抗体は huCRHR1 の本来の高次構造を認識している可能性が高く、昆虫細胞と哺乳動物細胞の糖鎖発現システムの違いによるわずかな立体構造の変化を認識していることが示唆された。

第4章 立体構造特異的ターゲティング (SST) 法における IgG モノクローナル抗体の効率的取得

4.1 目的

ここまで、SST 法に基づき、立体構造特異的モノクローナル抗体の作製に成功した。一般的に、モノクローナル抗体を分子標的治療薬 (抗体医薬) として使用する場合、目的抗原の本来の高次構造を認識することが非常に重要になる。本研究では作製されたモノクローナル抗体が立体構造を特異的に認識している可能性が示唆されたことから、この重要なポイントはクリアできたと考えている。もう一つ、分子標的治療薬として利用する場合、重要なことがある。それは、モノクローナル抗体のアイソタイプである。現在、認証されている分子標的治療薬の多くは IgG タイプの抗体である [57]。これは、IgG タイプの抗体は、他のアイソタイプと比較すると、親和性と安定性が非常に高く、抗体薬物複合体製剤に適している [59]。

そこで、本章では、SST 法の免疫化回数および免疫期間に着目し、作製された抗体産生ハイブリドーマ上清を評価することで、SST 法における IgG タイプ抗体の高効率作製条件を見出すことを目的とした。IgG を優先的に作製することができれば、SST 法の最大の特徴である立体構造特異的モノクローナル抗体の高効率作製とともに、将来の分子標的治療薬への期待がより高まると考えている。

4.2 材料と方法

4.2.1 材料

- AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG antibody, Fc_γ Fragment : Jackson ImmunoResearch
- AffiniPure Goat Anti-Mouse IgM antibody, μ Chain Specific : Jackson ImmunoResearch
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) : Nissui pharmaceutical
- E-RDF : 極東製薬工業
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 0.02% solution : Sigma Aldrich
- FCS : (コスモバイオ、gibco® by Life Technologies または Sigma Aldrich)
- HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) medium : Sigma Aldrich
- HT (hypoxanthine, thymidine) medium : Sigma Aldrich
- L-glutamine : Nissui pharmaceutical
- Lysing buffer : Sigma Aldrich
- RPMI1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) : Nissui pharmaceutical
- Goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) : Jackson ImmunoResearch
- Kanamycin sulfate : Meiji Seika Pharma
- *o*-phenylene diamine : 東京化成工業
- イソフルラン : ファイザー

4.2.1 マウスの免疫化 (DNA 免疫法および細胞免疫法) (2.2.5 に準ずる)

BALB/cAJcl マウス (5 週齢) に対してイソフルランを用いて麻酔した後、組換えプラスミド DNA (pBCMGS-huCRHR1) を DNA 免疫法のためにマウスの大腿筋に注射した。初回免疫では 50 μ L、追加免疫では 30 μ L の組換えプラスミド DNA (1.0 μ g/ μ L) をそれぞれ使用した。組換えプラスミド DNA を細胞に効果的に導入するために、注射した部分を挟むように 5 mm 幅の 2-Needles Array を大腿筋に数 mm 差し込み、直流矩形波の電気パルスを印加 (voltage : 200 V / cm、pulse length : 20 msec、 4 pulses, interval : 1 sec) することによって遺伝子導入を行った。3 週間間隔で 3~4 回の DNA 免疫法を行った後、PBS に懸濁した約 1×10^7 cells の huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を、融合の 3 日から 5 日前に最終免疫として腹腔内に注射投与した。

4.2.2 立体構造特異的ターゲティング (SST) 法 (図 1-10) (2.2.6 に準ずる)

立体構造特異的ターゲティング (SST) 法に基づき、立体構造特異的モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製した。DNA 免疫法および細胞免疫法によって感作されたマウスをイソフルランを用いて麻酔を行った。マウスの腹部あたりから切り込みを入れ、腹部から首あたりまで切開した。その後、麻酔が切れる前に心臓から血液を回収した。次に、マウスから脾臓を無菌的に取り出し、ラバーポリースマンによって脾臓から脾細胞を取り出し、2,000 rpm (800 \times g)、5 分間遠心分離し、上清を除去後、5 mL の Lysing buffer を加え、4 $^{\circ}$ C にて 5 分間静置して赤血球を溶解した。45 mL の 100 μ g / mL 硫酸カナマイシン入り DMEM (DMEM⁺) に懸濁後、再度、800 \times g、5 分間遠心分離し、10 mL の DMEM⁺ で洗浄した。800 \times g、5 分間遠心分離し、沈殿を 5 mL の DMEM⁺ で懸濁することで B 細胞を含む脾細胞懸濁液を調製した。

huCRHR1 発現ミエローマ細胞 ($2.0 - 3.0 \times 10^7$ cells) をフラスコから回収し、

800 rpm (130×g)、5 分間遠心分離した。その後、DMEM⁺で洗浄を行い、最終的に 5 mL の DMEM⁺で懸濁することで huCRHR1 発現ミエローマ細胞懸濁液を調製した。脾細胞および huCRHR1 発現ミエローマ細胞の生存率と細胞数を測定し、脾細胞数と huCRHR1 発現ミエローマ細胞数が 4 : 1 の割合になるように混合した。混合溶液を、1,000 rpm (200×g)、10 分間遠心分離し、1 mL の DMEM⁺に懸濁し、4 °C、30 分間、静置した。次に、4 mL の DMEM⁺を加え、全量を 5 mL にし、4 °C、30 分間、ゆっくりとローテーションした。このステップで、目的の感作 B 細胞は B 細胞受容体 (BCR) を介した抗原抗体反応に基づき huCRHR1 発現ミエローマ細胞上の huCRHR1 によって選択され、B 細胞-ミエローマ細胞複合体を形成した。複合体形成後、200 × g、10 分間遠心分離し、上清を完全に除去後、2 - 3 mL のスクロース等張緩衝液 [0.25 M sucrose in 2 mM sodium phosphate buffer (pH = 7.2) containing 0.1 mM CaCl₂ and 0.1 mM MgCl₂] で懸濁した。1 回の融合当たり、0.5 - 1.0 mL の B 細胞-ミエローマ細胞複合体を含む細胞懸濁液を白金電極内に入れ、2.0 - 3.0 kV / cm の直流矩形波の電気パルスで 1 秒間隔で 4 回繰り返し負荷して、選択的に融合した。

4.2.3 Cell-ELISA 法 (図 2-1) (2.2.7 に準ずる)

300 - 350 μ l の huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells / mL) およびコントロール CHO-K1 細胞 (1.0×10^5 cells / mL) を 96 穴プレートに播種し、37 °C、5% CO₂ 存在下で 2 日間培養した。各ウェルを PBS で洗浄した後、50 μ L のハイブリドーマ上清または希釈したマウス血清を添加し、4 °C で 2 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、1 / 10,000 倍希釈した goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase) を二次抗体として添加し、4 °C で 1 時間インキュベートした。各ウェルを PBS で少なくとも 5 回洗浄し、発色試薬 [0.1 M sodium citrate buffer (pH = 5.2) + *o*-phenylene diamine (1 mg/ml) +

0.02% H₂O₂] を 50 μL / ウェル加え、37 °C で 10-20 分間インキュベートし 1 M H₂SO₄ を 50 μl / ウェル加え反応を止め、490nm で吸光度を測定した。

4.2.4 ELISA 法 (アイソタイプの決定) (3.2.4 に準ずる)

抗原として AffiniPure Goat Anti-Mouse IgM antibody, μ Chain Specific (2.4 μg/μL) および AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG antibody, Fcγ Fragment (2.4 μg/μL) を使用した。抗原を 0.1 M NaHCO₃ (pH = 9.8) で 240 倍希釈 (10 ng/μL) した後、96 穴プレートに 50 μL ずつ添加し、4 °C で一晩インキュベートし、抗原をプレートに吸着させた。翌日、96 穴プレートを PBS で 3 回洗浄し、350 μL の 1% ゼラチン (1% ゼラチン in PBS) を添加し、37 °C で 2 時間以上静置することで、ブロッキングを行った。PBST (PBS + 0.05% Triton-X) で 3 回洗浄した後、50 μL の精製抗体もしくはマウス希釈血清を添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。PBST で 3 回洗浄し、PBST で 1 / 10,000 倍に希釈した 2 次抗体 [goat anti-mouse IgG (H+L) antibody conjugated with HRP (horseradish peroxidase)] を 50 μL 添加し、37 °C で 1 時間インキュベートした。PBST で 5 回以上洗浄した後、100 μL の発色剤 [0.1 M sodium citrate buffer (pH = 5.2) + o-phenylene diamine (1 mg/ml) + 0.02% H₂O₂] を添加し、37 °C で 10 分間インキュベートして発色させ、50 μL の 1 M H₂SO₄ を添加し、反応を停止し、490 nm で吸光度を測定した。

4.3 結果及び考察

4.3.1 DNA 免疫回数の違いによるマウス血清抗体価およびアイソタイプの変化

本研究では、SST 法に基づき複数回の融合実験を行った。各融合実験の DNA 免疫法の回数、免疫期間と最終細胞免疫から融合までの日数の違いによって3つのグループに分類した。その分類を表 4-1 に示した。

表 4-1 免疫条件の違いによるグループ分け

グループ	融合実験	DNA免疫回数 (免疫期間) ^{a)}	最終細胞免疫から融合 までの期間(日)
グループ 1	融合 I	3 (9)	3
グループ 2	融合 II	3 (8)	5
	融合 III	3 (11)	5
グループ 3	融合 IV	4 (12)	5
	融合 V	4 (15)	5

a) : DNAおよび細胞免疫の期間

グループ 1 では、DNA 免疫法を 3 回、免疫期間 9 週、最終免疫から融合までの日数は 3 日間とした。

グループ 2 では、DNA 免疫法を 3 回、免疫期間 8-11 週、最終免疫から融合までの日数は 5 日間とした。

グループ 3 では、DNA 免疫法を 4 回、免疫期間 12-15 週、最終免疫から融合までの日数は 5 日間とした。

各グループのマウス血清中のアイソタイプ量を ELISA によって評価した。

IgM 抗体産生の結果を図 4-1 に、IgG 抗体産生の結果を図 4-2 に示した。

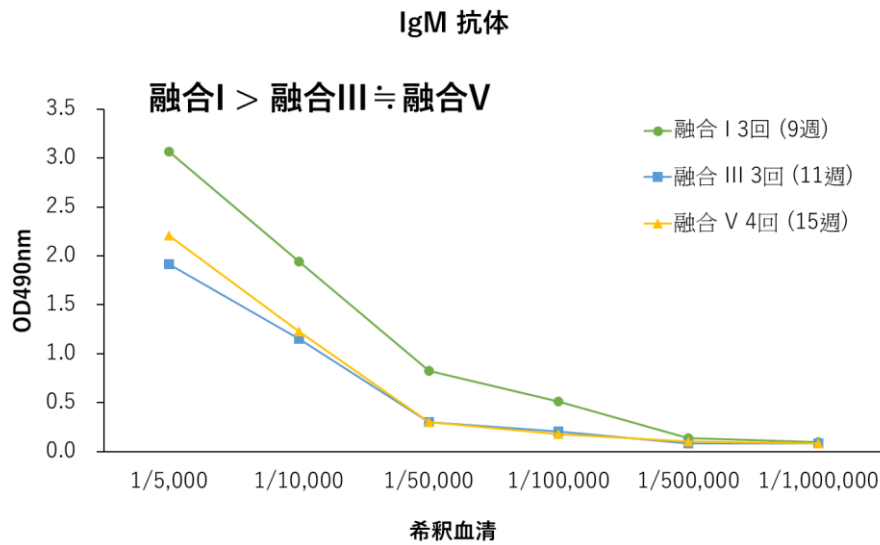


図 4-1 免疫化マウス血清中のIgM量

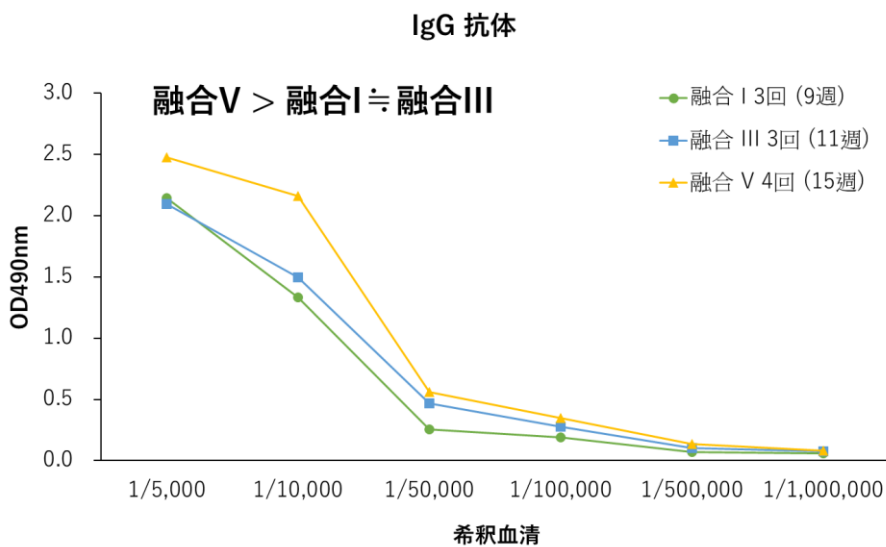


図 4-2 免疫化マウス血清中のIgG量

融合 I (グループ 1) の 3 回の DNA 免疫法と 1 回の細胞免疫法によって、血清中には多くの IgM 抗体が産生された。対照的に、融合 V (グループ 3) では、4 回の DNA 免疫法と 1 回の細胞免疫法によって、より多くの IgG 抗体の産生が認められた。さらに、各マウス血清中ポリクローナル抗体の huCRHR1 に対する抗体価を、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を用いた Cell-ELISA 法によって評価した (図 4-3)。

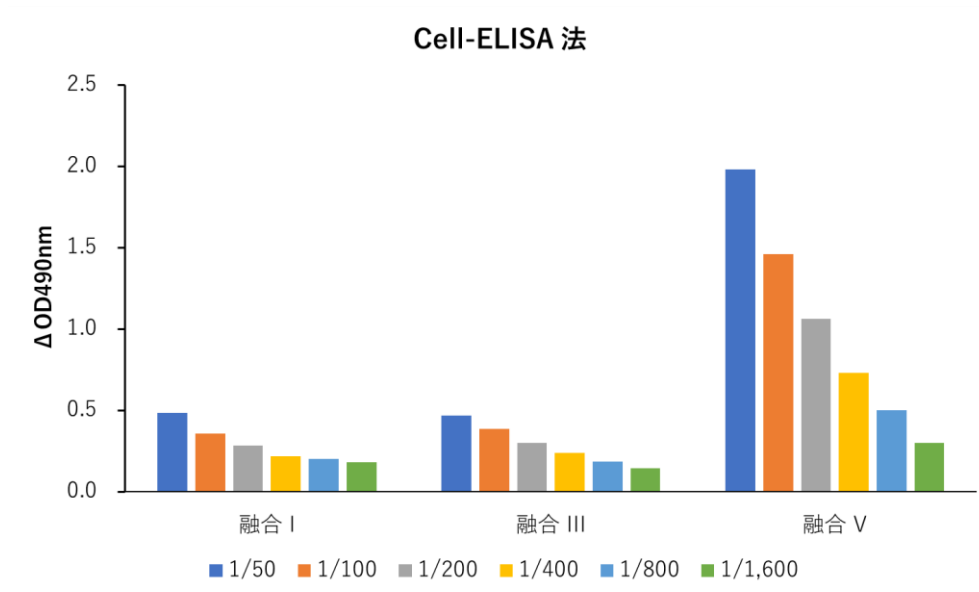


図 4-3 免疫化マウス血清中の抗体価

その結果、huCRHR1 に対する抗体の親和性は融合 V において、顕著に促進された。これらの結果は、DNA および細胞免疫を使用して目的の B リンパ球を感作した場合、IgM から IgG へのクラススイッチによって、標的抗原に対する立体特異的抗体の親和性がより高くなったことを示している。

4.3.2 SST法に基づくDNA免疫回数の違いによるハイブリドーマ上清中の抗体価およびアイソタイプの決定

DNA 免疫回数の違いによってモノクローナル抗体の力価およびアイソタイプに変化があるかを、SST 法に基づき作製したハイブリドーマ上清に着目して検証した。各融合実験において、Cell-ELISA 法によってモノクローナル抗体の抗体価を測定した。また、ELISA 法によってそのアイソタイプの決定を行った。各融合 I – V における、モノクローナル抗体の抗体価およびアイソタイプを図 4-4 から図 4-8 に示した。

グループ 1 の融合 I では、モノクローナル抗体のほとんどが、IgM タイプの抗体であった (図 4-4)。

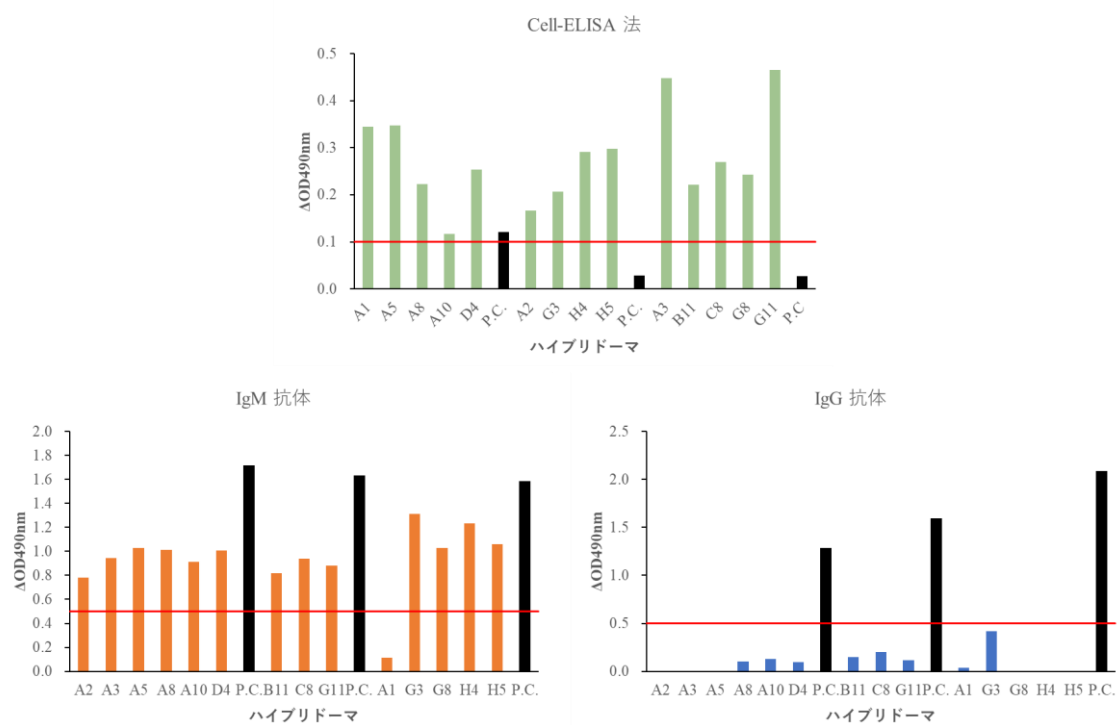


図 4-4 融合 I ハイブリドーマ上清の抗体価およびアイソタイプの決定

グループ 2 の融合 II および融合 III においては、モノクローナル抗体の多くが、IgM タイプであったが、一部のハイブリドーマ上清中では IgG タイプのモノクローナル抗体も同時に検出された (図 4-5 および図 4-6)。

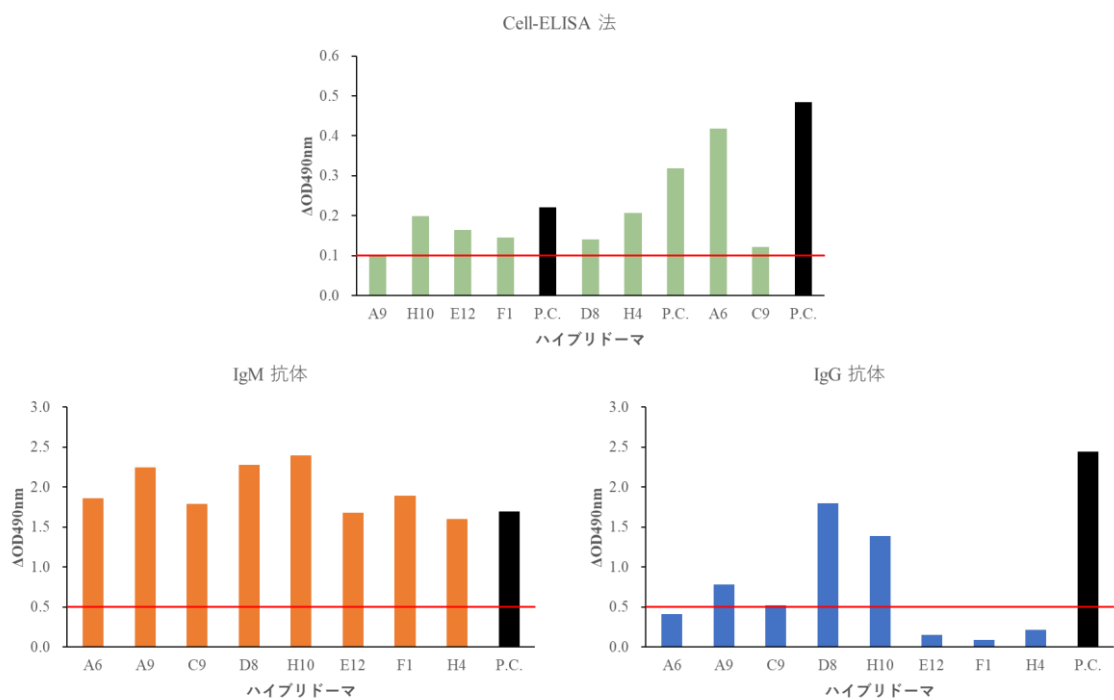


図4-5 融合Ⅱ ハイブリドーマ上清の抗体価およびアイソタイプの決定

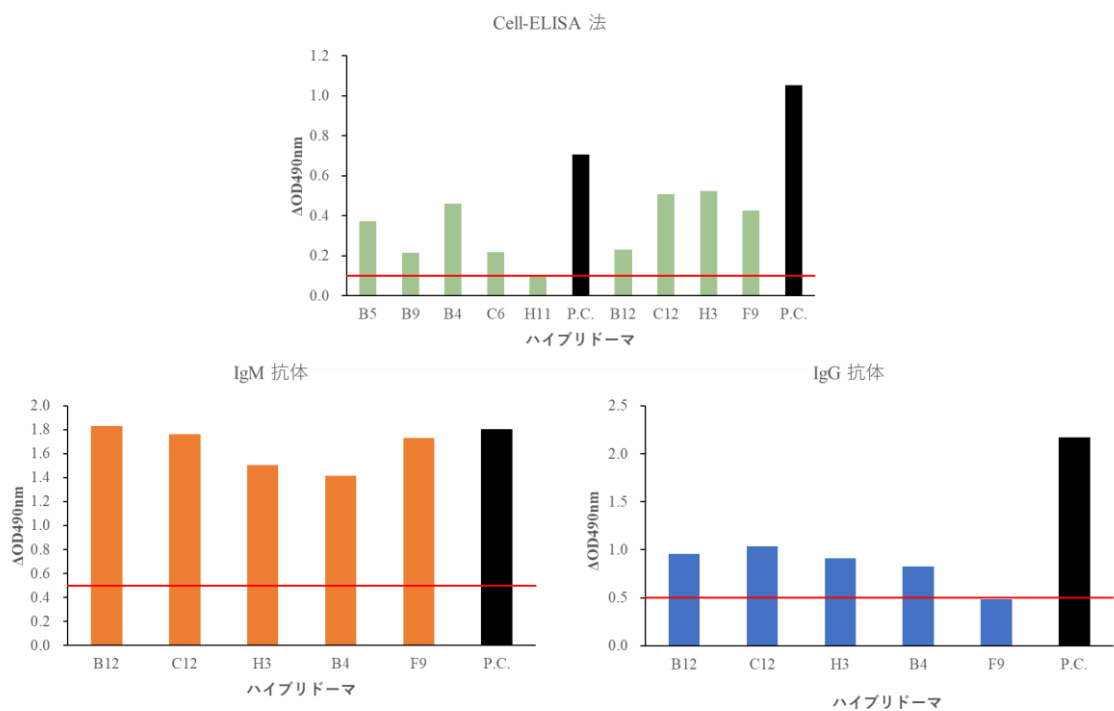


図 4-6 融合Ⅲ ハイブリドーマ上清の抗体価およびアイソタイプの決定

これに対して、グループ 3(融合Ⅳと融合Ⅴ)では、モノクローナル抗体のほとんどすべてが IgG タイプの抗体であった。しかし、一部に IgM タイプのモノクローナル抗体も確認された(図 4-7 および図 4-8)。

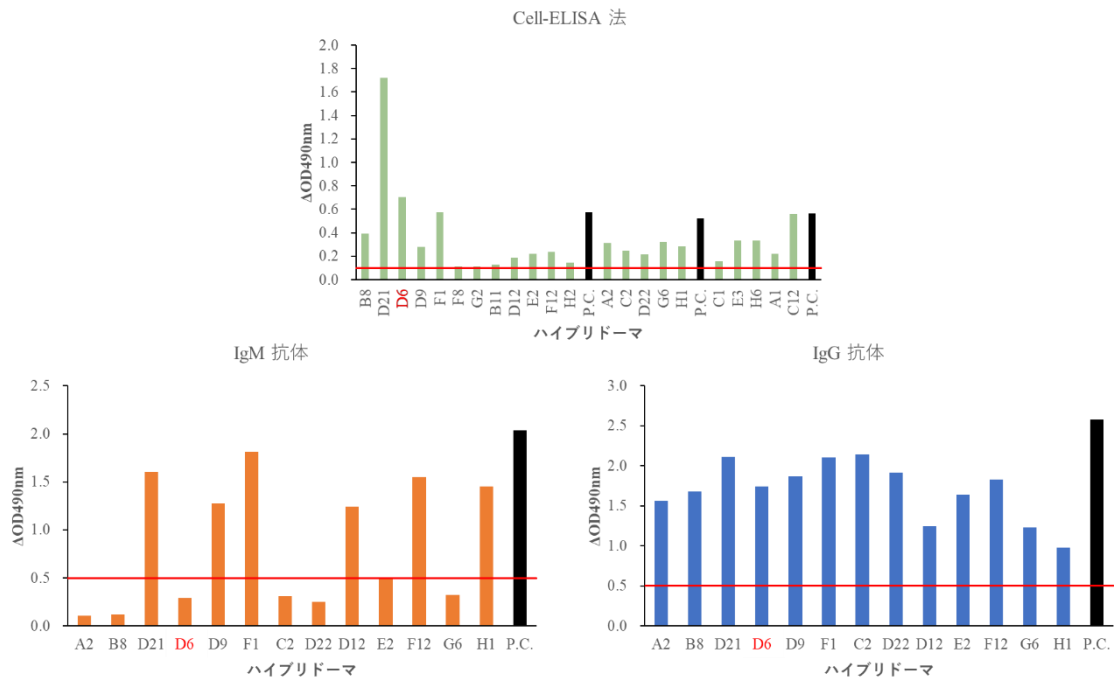


図 4-7 融合 IV ハイブリドーマ上清の抗体価およびアイソタイプの決定

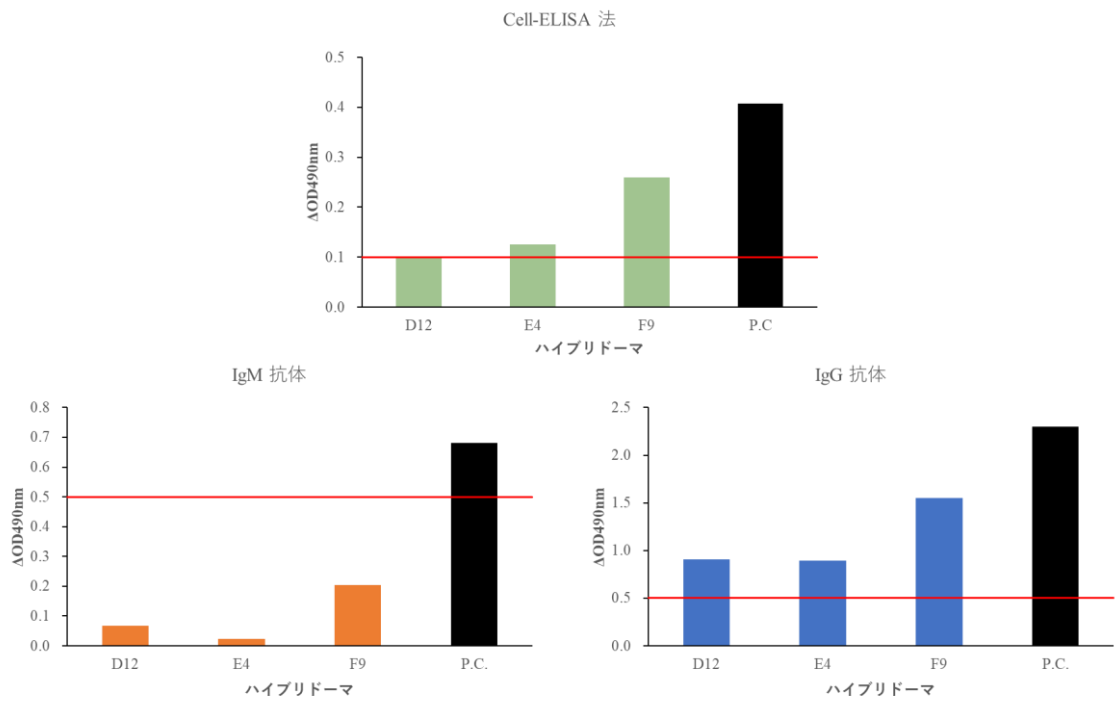


図 4-8 融合 V ハイブリドーマ上清の抗体価およびアイソタイプの決定

これらの結果から、DNA 免疫回数と免疫期間によって、作製されるモノクローナル抗体のアイソタイプ (IgM または IgG) に明確な変化が生じることが示唆された。

4.3.3 立体構造認識モノクローナル抗体のクラススイッチ

4.3.2の結果に基づき、さらに詳細に検討した。

一般に、外来抗原が宿主細胞に侵入すると、免疫応答の両輪の1つである体液性免疫によって抗体が産生される。外来抗原は、抗原提示細胞 (APC) によって貪食され、抗原由来ペプチドとともに MHC クラス II 分子に提示される。APC 上の抗原由来のペプチドはヘルパーT細胞を活性化し、一連の免疫応答を開始して体液性免疫を誘導する (図 1-2) [69-72]。体液性免疫が活性化される時、一部の B リンパ球はメモリーB細胞として保存され、クラススイッチが起こる。このメカニズムは一次配列認識の抗体産生で明らかになっているが、立体構造特異的な抗体産生においては、未だに未明である。DNA 免疫法が IgM から IgG への立体特異的抗体のクラススイッチを惹起できるかどうかは、解明されていない。

そこで、本研究で行った実験に基づき可能性を検討した。表 4-2 に結果をまとめた。

表 4-2 各融合実験におけるIgGおよびIgM抗体産生ハイブリドーマの割合

グループ	融合実験	ウェル数	ハイブリドーマ陽性数	Cell-ELISA陽性数 ^{a)}	アイソタイプ決定数 (A)	アイソタイプ		IgG割合 (B) / (A) × 100 (%)	IgM割合 (C) / (A) × 100 (%)
						IgG陽性数 ^{b)} (B)	IgM陽性数 ^{c)} (C)		
グループ1	融合 I	192	107	14	14	0	13	0	92.9
グループ2	融合 II	288	29	8	8	4	8	50.0	100.0
	融合 III	288	25	9	5	4	5	80.0	100.0
グループ3	融合 IV	192	78	22	13	13	6	100.0	46.2
	融合 V	192	22	3	3	3	0	100.0	0

a : ΔOD490nm > 0.1
b : ΔOD490nm > 0.5
c : ΔOD490nm > 0.5

立体構造特異的モノクローナル抗体のアイソタイプの割合は、グループ 1 からグループ 3 において、大きく変化していた。特にグループ 2 の融合 III とグループ 3 の融合 IV において顕著であった。融合 III および融合 IV における免

疫期間は約3ヶ月でほぼ同じであるが、DNA免疫回数が異なる(表4-1)。融合IIIでは3回、融合IVで4回であった。融合IIIと比較して、融合IVではIgMの産生率が100%から46.2%に減少し、IgGの産生が80.0%から100%に増加した(表4-2)。さらに、免疫グロブリンIgGの濃度を示す Δ OD値は融合IIIでは1.0未満であったが(図4-6)、融合IVではその濃度が1.0を超える抗体産生ハイブリドーマが多く確認できた(図4-7)。その中で、融合IVのハイブリドーマD6によって産生されるIgGタイプの立体構造特異的モノクローナル抗体は、Cell-ELISA法で0.7を超える高い Δ OD値を示した。この結果は、立体構造保持抗原によるBCRを介した感作B細胞の選択に起因すると考えられる。すなわち、特異性および親和性が高い、IgGタイプの抗体を産生する感作B細胞が優先的に選択された可能性を示唆する。興味深いことに、融合VにおいてIgM産生ハイブリドーマは、ほとんど存在しなかった(図4-8)。しかし、すべての立体特異的モノクローナル抗体の親和性は必ずしも高い結果ではなかった。これらの結果から、SST法に基づきIgGタイプ立体構造特異的モノクローナル抗体の選択的作製には、4回のDNA免疫法と3か月以上の免疫期間が適していることが示唆された。

4.4 まとめ

本章では、DNA 免疫法の回数と免疫期間の違いによって SST 法に基づき作製される立体構造認識モノクローナル抗体のアイソタイプの変化を見出した。まず、マウス血清中のポリクローナル抗体のアイソタイプを検証した。DNA 免疫法の回数が 3 回の場合、IgM の量が多い傾向にあった。一方、DNA 免疫法の回数が 4 回の場合、IgG の産生が多くなることが確認された。さらに、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対する親和性も 3 回の DNA 免疫法よりも 4 回の DNA 免疫法の方が高いことが示された。

SST 法によって作製されるモノクローナル抗体について、さらに詳細に検討した。その結果、グループ 1 では、ほとんどのハイブリドーマが IgM を示したが、グループ 2 においては、一部のハイブリドーマが IgG タイプの抗体も産生していた。グループ 3 では、すべてのハイブリドーマが IgG タイプの抗体を産生することが明らかになった。これらの結果から、立体構造特異的モノクローナル抗体の IgM から IgG クラススイッチは、DNA 免疫法の回数と免疫期間によって制御できる可能性が示唆された。さらに、その特徴は、SST 法に基づき作製されたハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体によく反映されていることが判明した。

これらの結果から、DNA 免疫回数 4 回、細胞免疫回数 1 回、免疫期間 3-4 ヶ月の免疫条件において、特異性および親和性が高い IgG タイプの立体構造特異的モノクローナル抗体 (ssmAb) を選択的に作製できることを見出した。

また、DNA を用いた免疫法においても、IgM から IgG へのクラススイッチを明らかにすることができた。

第 5 章 立体構造特異的モノクローナル抗体の結合部位

5.1 目的

ここまで、立体構造特異的モノクローナル抗体の作製とその評価および SST 法における IgG タイプモノクローナル抗体の効率的作製について議論した。その結果、SST 法に基づき作製されるモノクローナル抗体は、目的抗原の立体構造を特異的に認識でき、さらに、IgG タイプのモノクローナルを選択的に作製できる可能性が示された。次に、作製された立体構造特異的モノクローナル抗体が目的抗原のどの部分を認識しているかに着目した。

そこで、本章では、3 種類の評価法から、抗体の抗原認識部位を明らかにすることを目的とした。初めに、3 種類の哺乳動物 (ヒト、マウス、チャイニーズハムスター) のアミノ酸配列情報に基づいた比較を行い、考察した。また、アミノ酸配列から予測される BepiPred-2.0 のツールを使用したエピトープ解析からも考察した。さらに、huCRHR1 の 3D 構造に着目し評価を行った。これらの情報から、抗原認識部位を予想した。

5.2 結果および考察

5.2.1 アミノ酸配列からの考察

ヒト、マウス、チャイニーズハムスター由来の CRHR1 のアミノ酸配列を NICB から得た [73]。シグナルペプチドは SignalP4.1 Server によって検索し、細胞外、膜貫通、細胞内ドメインの配列およびジスルフィド結合、糖鎖付加は UniProt によって予測した [74, 75]。それらの情報を図 5-1-1 にまとめた。

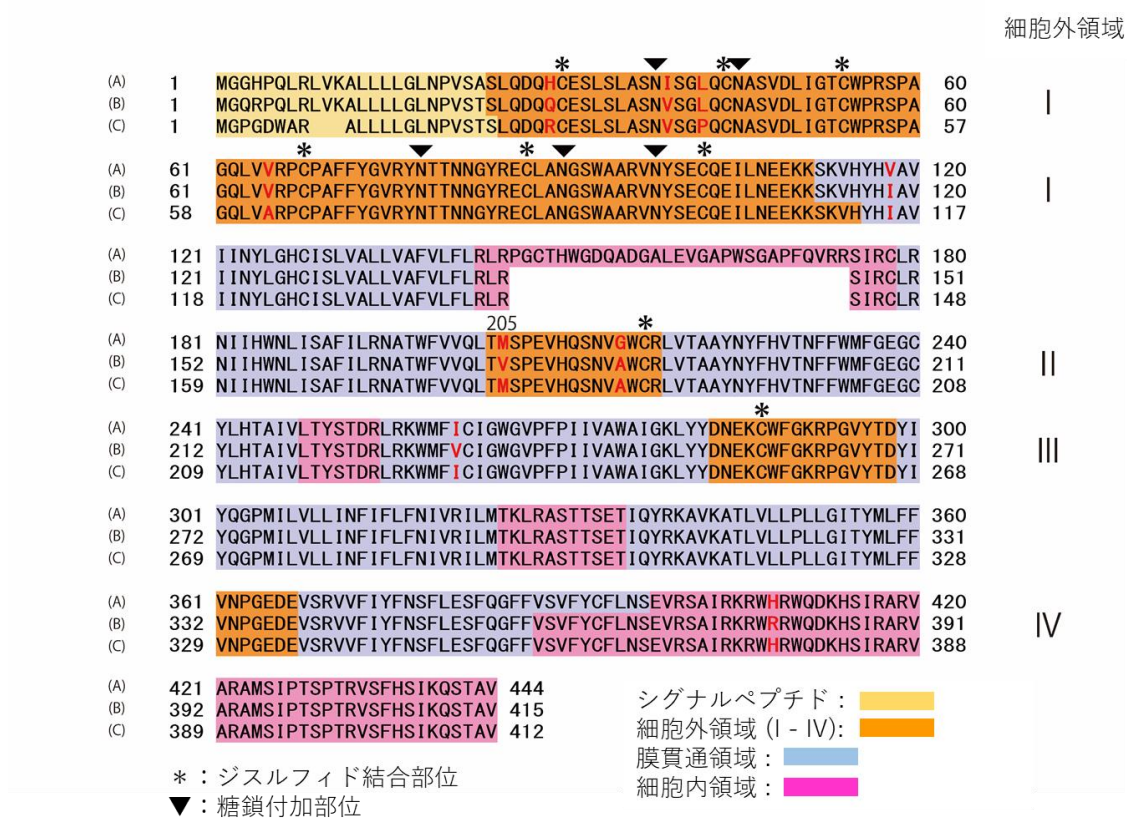


図 5-1-1 (A)ヒト、(B)マウス、(C)チャイニーズハムスター由来CRHR1アミノ酸配列

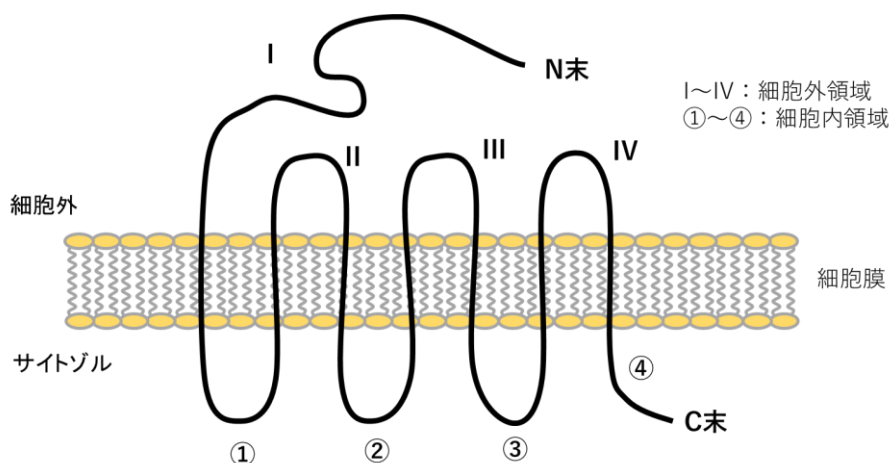


図 5-1-2 GPCRの構造

ヒト、マウス、チャイニーズハムスターにおける CRHR1 のアミノ酸配列を比較し、相同性を分析して、立体構造エピトープを推測した [76]。ヒトとマウスおよびチャイニーズハムスターのアミノ酸配列の最大の違いは、7回膜貫通タンパク質の細胞内の最初の領域に存在する (図 5-1-1、上から3段目ピンク色領域、図 5-1-2、細胞内領域 ①)。この領域は、ヒト CRHR1 の場合、36アミノ酸残基から成り、マウスおよびチャイニーズハムスターでは、7アミノ酸残基から構成されている。変性したヒト CRHR1 に対する特異的抗体を作製する場合、この細胞内の最初の領域が特定のエピトープとして最も可能性が高い部位であると考えられる。しかし、本研究で使用した DNA 免疫法および細胞免疫法では、huCRHR1 は立体構造を保持した状態で膜表面に発現されていることから、細胞外領域がエピトープの候補になる。したがって、本研究で作製されたモノクローナル抗体は細胞内の最初のループと交差反応することは、おそらくないと考えられる。さらに、SST 法によって作製されたモノクローナル抗体が、細胞表面の huCRHR1 の本来の高次構造に特異的に結合できる結果からも、精製モノクローナル抗体は、細胞外領域 (図 5-1-1、図 5-1-2、I-IV の領域) 上に存在する立体構造エピトープを認識する可能性が非常に高いと推測される。

システイン残基 30 と 54、44 と 87、68 と 102、および 217 と 287 の間の 4 つ

のジスルフィド結合がヒト CRHR1 で形成されると報告されている [43, 77] 。残基 217 と 287 のジスルフィド結合は、第 II および第 III の細胞外領域を架橋し、他のものは、第 I の細胞外領域内で架橋されている。ジスルフィド結合は安定した三次元構造の形成に寄与すると推測されるため、精製モノクローナル抗体がジスルフィド結合に隣接する配列の立体構造エピトープを認識している可能性があると考えられる。

CHO 細胞 (コントロール細胞) は、細胞表面にチャイニーズハムスター由来の CRHR1 を発現している [56] 。ここで、重要なことは、ヒト CRHR1 の本来の高次構造に特異的なモノクローナル抗体が、チャイニーズハムスターの CRHR1 とも交差反応した理由である。マウスを免疫動物として使用しているため、ヒト CRHR1 の立体構造エピトープは、マウスの免疫系によって外来抗原として認識される必要がある。その結果、マウスの B リンパ球がヒト CRHR1 によって感作され、ヒト CRHR1 に対する抗血清がマウス内で産生されたと考えられる。ところが、チャイニーズハムスター由来の CRHR1 とヒト CRHR1 に対する立体構造特異的モノクローナル抗体の交差反応性から判断すると、CRHR1 のアミノ酸配列はヒトとチャイニーズハムスターの間で同じで、マウスの配列とは異なると考えられる。この点を考慮すると、エピトープとなりうるアミノ酸配列は細胞外ドメインの 1 つの部位に限定される。すなわち、第 II 細胞外ドメインにおけるヒトの M (メチオニン) 205、マウスの V (バリン) 176、チャイニーズハムスターの M (メチオニン) 183 である。3 種類の哺乳動物で CRHR1 のアミノ酸番号が異なっているが、アラインメントに基づくと同じ位置に存在している (図 5-1-1) 。

立体構造エピトープに関与しているもう一つの可能性は、糖鎖構造の空間配置の違いと考えられる。ヒト CRHR1 には 5 つの N-グリコシル化部位があり、第 I 細胞外領域の 38、45、78、90 および 98 のアスパラギン残基に結合してい

ることが報告されている [78, 79]。これらの糖鎖は 3 種の哺乳動物で共通であるが、上記の第 II 細胞外領域 (ヒト CRHR1 の M205) のアミノ酸残基の大きな違いにより、細胞外領域の糖鎖の空間位置が変わる可能性がある。これによって、ヒト CRHR1 に特異的な立体構造エピトープが提供されると推測される。実際、ヒト CRHR1 に対するモノクローナル抗体は、異なる糖鎖構造を持つ Sf9 昆虫細胞で発現したヒト CRHR1 に対して交差反応性を示さなかった。しかし、これらのことはあくまでも推論であるため、今後、X 線結晶解析などの手法を用いた、huCRHR1 の詳細な構造解析が必要と考えている。

5.2.2 BepiPred-2.0 ツールを用いたエピトープ (抗原決定基) の予測

BepiPred-2.0 ツールを用いて、アミノ酸配列からの構造予測を行った [80]。アミノ酸情報から、 α ヘリックス、 β シートおよびループの構造になりやすいかをスコアとして算出し、図 5-2 に示した。

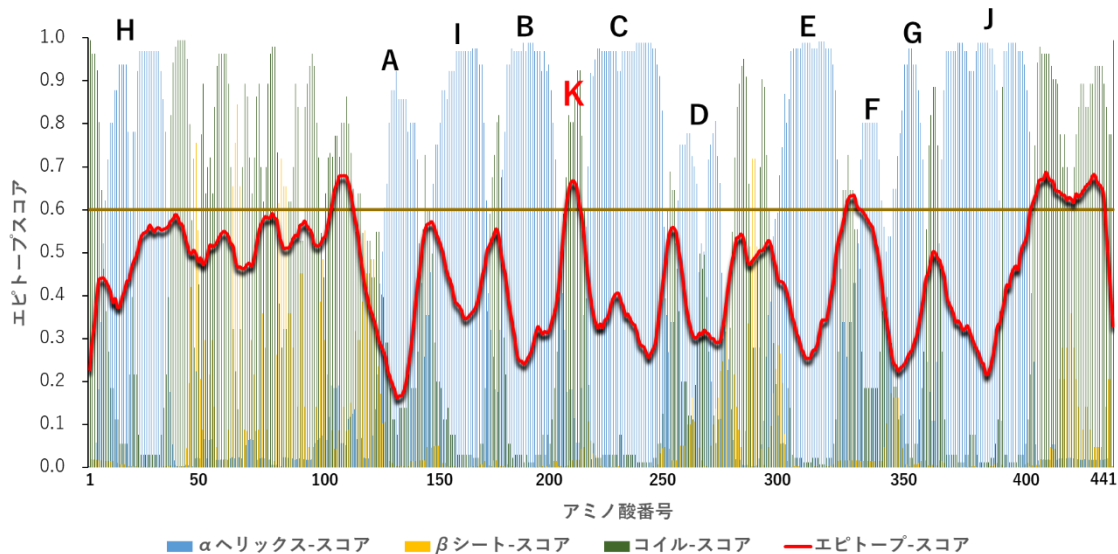


図 5-2 BepiPred-2.0ツールによる二次構造およびエピトープ予測

各スコアは 1.0 を最大として算出され、1.0 に近ければその構造になりやすいことを示している。各スコアの閾値を 0.6 とした。まず、 α ヘリックスについて考察した。huCRHR1 は GPCR の 1 つで、7 回膜貫通型タンパク質である。図 5-1-1 より、膜貫通領域はアミノ酸番号 112-142、179-203、219-247、255-282、299-324、336-360、368-397 の 7 ヲ所の領域に存在する。実際のスコアを見てみると 129-143 (A)、180-204 (B)、217-249 (C)、256-274 (D)、300-325 (E)、335-362 (F)、370-395 (G) のそれぞれの領域は α ヘリックスに対応している(図 5-2)。アミノ酸番号 8-35 (H) の領域はシグナル配列であるため、 α ヘリックスを形成すると考えられる。150-173 (I) の領域は、第①細胞内領域でマウスやチャイニーズには存在しておらず、ヒトにのみ存在する配列である。397-408 (J) は第④細胞内領域である (図 5-1-2)。

βシートに関しては、第I細胞外領域で3か所(46-48、63-66、83-86)、第III細胞外領域で1か所(287-290)が確認できた。その他のアミノ酸配列はコイル構造が優位であった。

ここで、エピトープスコアについて考察した。閾値を0.6以上にした場合、4か所のエピトープ部位が確認できた。エピトープスコアが0.6以上の配列を抽出し、図5-3とした。

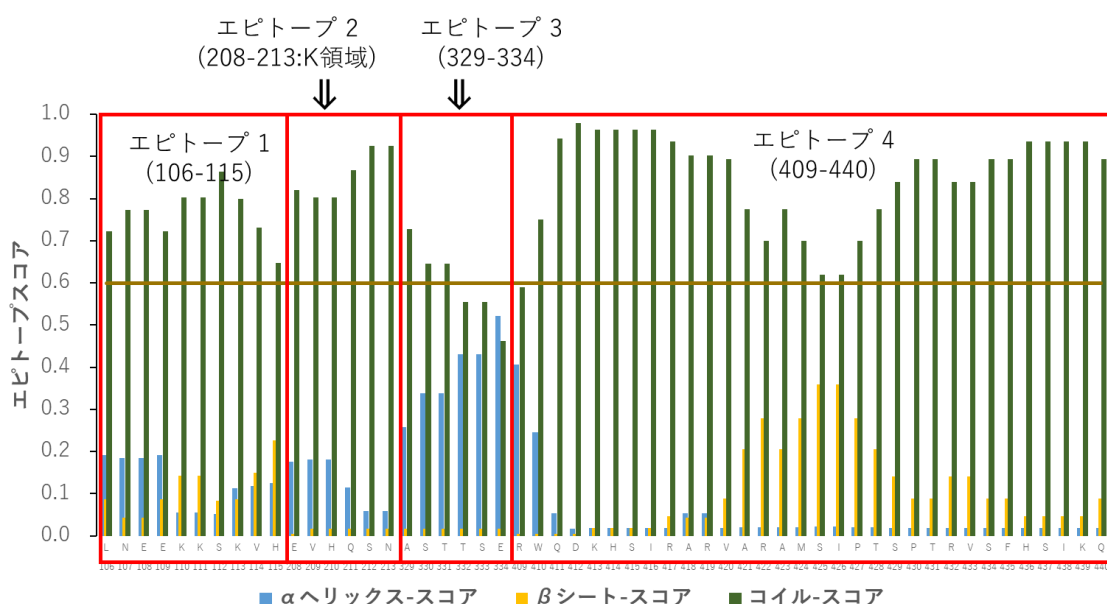


図 5-3 BepiPred-2.0ツールによるエピトープ解析(エピトープスコア：0.6以上)

それぞれの領域は、アミノ酸番号106-115、208-213、329-334、409-440であった。329-334および409-440の配列は細胞内領域であるため、SST法において立体構造エピトープになることは難しいと考えられた。そこで、106-115エピトープおよび208-213エピトープについて考察した。106-115エピトープのアミノ酸配列106-111は細胞外ドメインであるが、その近辺を含むすべてのアミノ酸が、ヒト、マウス、チャイニーズハムスターで同じであるため、自己のアミノ酸配列に対しては、抗体が作製されないと推測される。しかし、本研究のウェスタンブロッティング(図3-10)で使用したヤギで作製された一次構造認識の抗CRHR1抗体(SAB2500272)はCRHR1のアミノ酸配列の107-117の配列を認識

しているため、一次構造認識のエピトープの可能性が高いと考えられる。一方、208–213 エピトープ (K) は第 II 細胞外領域に含まれている。近傍のアミノ酸配列を確認してみると、205 番目の M (メチオニン) はヒトとチャイニーズハムスターでは同じであるが、マウスでは V (バリン) になっており一部が異なっている。さらに、217 と 287 間のシステイン残基でジスルフィド結合を形成しており、立体構造が安定化され、立体構造認識モノクローナル抗体の立体構造エピトープの構成要素の一部に成り得ると推測された。

BepiPred-2.0 ツールを用いたエピトープ予測は、一次構造エピトープの予測ではあるが、208–213 エピトープを含む配列は、立体構造認識エピトープにおいても重要な部位であると考えられる。205 番目の M を含む第 II 細胞外領域が立体構造エピトープに含まれる可能性が高いと推測される。さらに、昆虫細胞の結果から判断して、第 I 細胞外領域内の糖鎖構造も立体構造エピトープに大きく関与していると考えられる。

本解析は、あくまでも、huCRHR1 の一次構造に基づくエピトープ予測であるが、立体構造エピトープは一次構造エピトープ、糖鎖構造が複数組み合わさって形成されている可能性がある。その点においては、高次構造エピトープの予測にも寄与できると推測される。

5.2.3 huCRHR1 の 3D 構造からのエピトープ予測

実際の huCRHR1 の 3D 構造を用いて、立体構造認識モノクローナル抗体の立体構造エピトープを考察した。huCRHR1 の 3D 構造は PDB の 4K5Y を使用し、図 5-4-1 に示した [43, 81] 。

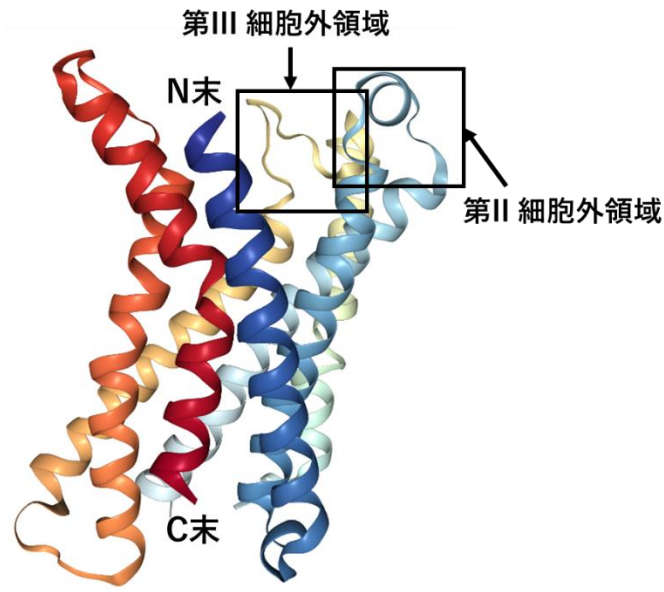


図 5-4-1 huCRHR1の3D構造 [117番目のH (ヒスチジン) から]

一部のアミノ酸が置換されているが大部分は同じであり、117番目のH (ヒスチジン) からの構造が示されている。7本の α ヘリックスが存在し、膜貫通領域となっている。本研究では、第II細胞外領域と第III細胞外領域に着目した (図 5-4-1、図 5-4-2) 。

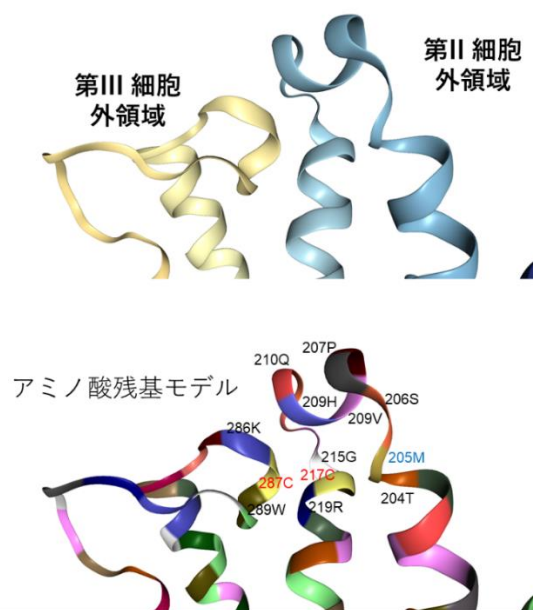


図 5-4-2 huCRHR1の3D構造 (第II 細胞外領域と第III 細胞外領域)

上パネルでは、第II 細胞外領域と第III 細胞外領域を異なる色で示している。下パネルはアミノ酸の種類によって異なる色を示している。217 と 287 間のシステイン残基でジスルフィド結合を形成しており、第II 細胞外領域と第III 細胞外領域が空間的に近くに存在していることが示されている。さらに、205 番目のメチオニン残基は、対応しているアミノ酸残基においてチャイニーズハムスターでは同じメチオニン残基であるが、マウスではバリン残基となり異なっている (図 5-1-1)。これらのことから、第II 細胞外領域と第III 細胞外領域は立体構造エピトープとしての重要な領域になる可能性が示唆された。

仮に、作製されたモノクローナル抗体が第II 細胞外領域と第III 細胞外領域を含む立体構造エピトープを認識する場合、図 3-17-2 においてリガンド分子である CRH と競合しなかったことが説明できる。CRH の結合部位は huCRHR1 では第I 細胞外領域に存在するアミノ酸残基 42-105 であることが報告されており、作製されたモノクローナル抗体と CRH が競合しないことが説明できる [65, 68]。

5.3 まとめ

本章では、3種類の解析結果から立体構造特異的モノクローナル抗体のエピトープを予測した。その結果、アミノ酸配列のアラインメント情報に基づいて、ヒトとチャイニーズハムスターで同じ、205番目のメチオニンを含む配列、その近傍のジスルフィド結合(217と287)、さらに、第I細胞外領域に存在する糖鎖構造が、立体構造エピトープを形成している可能性が高いと推測された。また、BepiPred-2.0 ツールを使用したエピトープ解析では、アミノ酸配列に基づき、一次構造エピトープになりうる領域が算出された。中でも、第II細胞外領域に存在する208-213のアミノ酸配列のエピトープが、高次構造エピトープにとっても重要である可能性が示唆された。huCRHR1の3D構造を用いた解析では、第II細胞外領域と第III細胞外領域が空間的に近くに存在していることが示された。したがって、第II細胞外領域と第III細胞外領域は立体構造エピトープとしての重要な領域になる可能性が示唆された。

この3種類の解析から、本研究で作製されたモノクローナル抗体の立体構造エピトープの一部は、第II細胞外領域に存在し、さらに、糖鎖構造も高次構造エピトープに含まれる可能性が示された。

第 6 章 総括

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) の効率的作製とその医工応用を目的とした。

第 2 章では、SST 法に基づき、huCRHR1 に対する立体構造特異的モノクローナル抗体を作製した。まず、SST 法に必要な huCRHR1 発現ミエローマ細胞と立体構造特異的モノクローナル抗体の評価に使用する huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を作製した。さらに、SST 法で重要なポイントの一つである、B 細胞-ミエローマ細胞複合体に着目し検討した。その結果、huCRHR1 発現ミエローマ細胞を用いた感作 B 細胞との複合体形成は、コントロールミエローマ細胞と比較して約 3 倍の高い効率を確認した。このことは、DNA 免疫法によって産生された感作 B 細胞の B 細胞受容体を介して、ミエローマ細胞上の立体構造保持抗原 huCRHR1 との抗原抗体反応によって複合体を形成したと考えられた。複合体の形成が確認できたため、SST 法に基づきハイブリドーマを作製したところ、多くの目的抗体産生ハイブリドーマを作製することができた。Cell-ELISA 法陽性の割合がハイブリドーマ陽性ウェルの 28.6% 以上と比較的高く、SST 法は有用なモノクローナル抗体の作製法の可能性が示唆された

第 3 章では、作製されたモノクローナル抗体を様々な方法で評価した。まず、プロテイン A カラムを用いて、クローン化ハイブリドーマ上清中のモノクローナル抗体の精製を行い、3 種類の精製モノクローナル抗体 (C7-E3、C7-G1、C7-H6) を調製することに成功した。各モノクローナル抗体は SDS-PAGE およびウェスタンブロットリング解析によって、純度の極めて高い精製モノクローナル

抗体であることを確認した。精製モノクローナル抗体は、EphA2 発現 MDA-MB-231 細胞との比較において、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対する特異的親和性を示した。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。すべての精製モノクローナル抗体は約 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で取得できた。

次に、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞を用いて精製モノクローナル抗体の様々な評価を行った。免疫蛍光染色法では、精製モノクローナル抗体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解析においては、精製モノクローナル抗体との特異的な結合を認めることができなかった。さらに、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、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対する精製モノクローナル抗体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確認された。このことから、精製モノクローナル抗体は 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 に対しては、親和性の低下が示唆された。

バキュロウイルスを用いた、精製モノクローナル抗体の評価では、組換えバキュロウイルス感染 Sf9 細胞を用いて検討した。組換えバキュロウイルスを感染させた Sf9 細胞を用いた免疫蛍光染色において、クローン C7-E3 由来の精製モノクローナル抗体のわずかな結合を除き、特異的親和性を確認することができなかった。この結果は、昆虫細胞と哺乳動物細胞のわずかな糖鎖構造の違いに起因する可能性が示唆された。

さらに、精製モノクローナル抗体のリガンド分子との競合アッセイを行った。その結果、CRH の添加量が増えるにつれて、わずかではあるが、精製モノクローナル抗体の結合量も増加した。これによって、精製モノクローナル抗体の認識部位と CRH の認識部位は異なる可能性が示された。精製モノクローナル抗体は

huCRHR1 の本来の高次構造を認識している可能性が高く、昆虫細胞と哺乳動物細胞の発現システムの違いによるわずかな立体構造の差異を認識していることが推測された。

第 4 章では、DNA 免疫法の回数および免疫期間の違いによる立体構造認識モノクローナル抗体のアイソタイプの変化を見出した。マウス血清中のポリクローナル抗体のアイソタイプ量を検証した結果、DNA 免疫法の回数が 3 回の場合、IgM の産生量が多い傾向にあった。一方、DNA 免疫法の回数が 4 回の場合、IgG の産生量が多いことが確認された。さらに、huCRHR1 発現 CHO-K1 細胞に対する抗体の親和性も 3 回の DNA 免疫よりも 4 回の DNA 免疫の方が高いことが示された。融合実験の結果、DNA 免疫回数 4 回、細胞免疫回数 1 回、免疫期間 3-4 ヶ月の免疫条件において、特異性および親和性が高い IgG タイプの立体構造特異的モノクローナル抗体を選択的に作製できることを見出した。

第 5 章では、作製されたモノクローナル抗体の高次構造エピトープを考察した。第 3 章で述べた糖鎖構造の重要性に加えて、アミノ酸配列情報に基づき、ヒトとチャイニーズハムスターで共通な 205 番目のメチオニン (M) を含む領域が高次構造エピトープに関与していると推測された。また、BepiPred-2.0 ツールを使用したエピトープ解析においても、間接的ではあるが 208-213 のアミノ酸配列が高次構造エピトープに含まれる可能性が推測された。本研究で作製されたモノクローナル抗体は第 II 細胞外領域に高次構造エピトープの一部が存在すると予測された。さらに、3D 構造モデルに基づき考察したところ、第 II 細胞外領域と第 III 細胞外領域は空間的に近い位置に存在していることが示された。このことから、第 II 細胞外領域と第 III 細胞外領域を含む立体構造エピトープが存在する可能性も示唆された。

これらの結果から、SST 法は目的抗原の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体を効率的に作製できることが示され、この独自技術は、膜タンパク

質のみならず、可溶性タンパク質にも応用できる可能性がある。立体特異的モノクローナル抗体を作製するための重要なポイントは、立体構造保持抗原発現ミエローマ細胞による、BCR を介した感作 B リンパ球の選択にある。すなわち、生体内には立体構造を認識する感作 B 細胞が存在することが明らかになった。さらに、すべてのタンパク質は、その機能を発揮するために特有の立体構造をもっているため、目的抗原の立体構造を特異的に認識するモノクローナル抗体は非常に合理的であると考えられる。

本研究において、新たな疑問や課題も生じた。大きな疑問の一つは立体構造認識感作 B 細胞がどのようにして産生されるかである。一つの仮説として、生体内では立体構造を認識することができる未感作 B 細胞が存在していると考えている。その未感作 B 細胞が DNA 免疫法や細胞免疫法によって立体構造を保持した状態の抗原と出会うことで分化し、感作 B 細胞となり、一連の免疫応答が開始されるのではないかと推測している。しかし、抗原が立体構造を保持した状態で、どの様にして抗原提示細胞 (APC) 上に示されるかは不明のままである。このメカニズムを解明することが今後の課題であるのと同時に、立体構造認識モノクローナル抗体の作製の重要なポイントであると考えている。

本研究では、ハイブリドーマテクノロジーに基づき、GPCR に対する立体構造特異的モノクローナル抗体の作製法の創製をめざし、この世界初の試みに対して有望な結果が得られた。本研究の成果によって、世界の分子標的治療薬 (抗体医薬) に対する考え方が根本的に変わる可能性がある。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、より特異的かつ高親和性で認識できると予測される。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として期待できる。

第7章 謝辞

本論文は私が三重大学 大学院工学研究科 材料科学専攻 博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。

本論文を遂行するにあたり、本研究室に配属されて以来、本研究の構想からデータ解析, 論文作成に至るまで, 終始一貫して温かいご指導とご鞭撻を頂きました。三重大学 大学院工学研究科 湊元幹太 教授ならびに同 富田昌弘 教授 (現 名誉教授) に深く御礼申し上げます。富田昌弘先生には、研究の基礎や研究者の心構えなど、多岐にわたり、多くのご指導およびご助言を賜りました。感謝の意を表します。また、湊元幹太先生には、多くの実験に関するご助言や考え方など、幅広いご意見を賜りましたことを、心より感謝いたします。また、本論文の審査の過程で副査を快く引き受けてくださり、貴重なご意見を賜りました三重大学 大学院工学研究科 宮本啓一 教授、同 北川敏一 教授に厚く御礼申し上げます。さらに、私の研究に対して、様々なご意見やご助言を賜りました分子生物工学研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

第 8 章 参考文献

1. Kaplon, H., Reichert, J.M., Antibodies to watch in 2019. *MAbs*. 2019, 2, 219-238.
2. Shepard, H.M., Phillips, G.L., D Thanos, C., Feldmann, M., Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clin Med (Lond)*. 2017, 3, 220-232.
3. Nguyen, M.N., Pradhan, M.R., Verma, C., Zhong, P., The interfacial character of antibody paratopes: analysis of antibody-antigen structures. *Bioinformatics*. 2017, 33(19), 2971-2976.
4. Kai, J.R., Rahul, V., Butler, N.S., Anti-malarial humoral immunity: the long and short of it. *Microbes and Infection*, 2021, 23, 104807,
5. Köhler, G., Milstein, C., Continuous cultures of fused cells selecting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975, 256, 495-497.
6. De StGroth, S.F., Scheidegger, D., Production of monoclonal antibodies : strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*. 1980, 35, 1-21.
7. Zimmermann, U., Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta*. 1982, 694, 227-277.

8. Ohkohchi, N., Itagaki, H., Doi, H., Taguchi, Y., Satomi, S., Satoh, S., New technique for producing hybridoma by using laser radiation. *Lasers Surg. Med.* 2000, 27, 262-268.
9. Lo, M.M.S., Tsong, T.Y., Conrad, M.K., Strittmatter, S.M., Hester, L.D., Snyder, S.H., Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature*. 1984 5980 792-794.
10. Tomita, M., Sugi, H., Ozawa, K., Tsong, T.Y., Yoshimura, T., Targeting antigen-specific receptors on B lymphocytes to generate high yields of specific monoclonal antibodies directed against biologically active lower antigenic peptides within presenilin 1. *J. Immunol. Methods*, 2001, 251, 31-43.
11. Tomita, M., Fukuda, T., Ozu, A., Kimura, K., Tsong, T.Y., Yoshimura, T. Antigen-based immunofluorescence analysis of B-cell targeting : advanced technology for the generation of novel monoclonal antibodies with high efficiency and selectivity. *Hybridoma (Larchmt)*, 2006, 25, 283-292.
12. Tomita, M., Tsumoto, K., Recent advances in antigen-based generation of monoclonal antibodies. *Curr. Immunol. Rev.*, 2010, 6, 56-61.
13. Iwai, Y., Terawaki, S., Honjo, T., PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol.* 2005, 17(2), 133-144.

14. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., Honjo, T., Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992, 11(11), 3887-3895.
15. Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T., Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000, 192(7), 1027-1034.
16. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(19), 12293-12297
17. Zhou, P., Yang, X.L., Wang, X.G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.L., Chen, H.D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.D., Liu, M.Q., Chen, Y., Shen, X.R., Wang, X., Zheng, X.S., Zhao, K., Chen, Q.J., Deng, F., Liu, L.L., Yan, B., Zhan, F.X., Wang, Y.Y., Xiao, G.F., Shi, Z.L., A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020, 579(7798), 270-273.
18. Saghazadeh, A., Rezaei, N., Immune-epidemiological parameters of the novel coronavirus - a perspective. *Expert Rev Clin Immunol.* 2020, 16(5), 465-470.

19. Jahanshahlu, L., Rezaei, N., Monoclonal antibody as a potential anti-COVID-19. *Biomed Pharmacother.* 2020, 129, 110337.
20. Peaper, D.R., Landry, M.L., Rapid diagnosis of influenza: state of the art. *Clin Lab Med.* 2014, 34(2), 365-85.
21. Parray, H.A., Shukla, S., Samal, S., Shrivastava, T., Ahmed, S., Sharma, C., Kumar, R. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int Immunopharmacol.* 2020, 85, 106639.
22. Tsumoto, K., Isozaki, Y., Tomita. M., 25.6 Production of monoclonal antibodies, in : R.I. Freshney (Ed.), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 7th. Edition *Willey Blackwell, Hoboken*, 2016, 544-545 (25. Supplementary Material, pp.102-113).
23. Tsumoto, K., Isozaki, Y., Yagami, H., Tomita, M., Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy*, 2019, 11, 119-127.
24. Yamasaki, Y., Miyamae, C., Isozaki, Y., Ichikawa, K., Kaneko, Y., Oda, Y., Murayama, T., Sakurai, T., Tamai, K., Tsumoto, K., Tomita, M., Optimization of stereospecific targeting technique for selective production of monoclonal antibodies against native ephrin type-A receptor 2. *J. Immunol. Methods*, 2020, 484–485, 112813.

25. Donnelly, J.J., Ulmer, J.B., Shiver, J.W., Liu, M.A., DNA vaccines. *Annu Rev Immunol.* 1997, 15, 617-648.
26. Liu, S., Wang, S., Lu, S. DNA immunization as a technology platform for monoclonal antibody induction. *Emerg Microbes Infect.* 2016, 5(4), e33.
27. Moraes, J.Z., Hamaguchi, B., Braggion, C., Speciale, E.R., Cesar, F.B.V., Soares, G.F.S., Osaki, J.H., Pereira, T.M., Aguiar R.B., Hybridoma technology: is it still useful?. *Current Research in Immunology*, 2021, 2, 32-40,
28. Costagliola, S., Rodien, P., Many, M.C., Ludgate, M., Vassart, G., Genetic immunization against the human thyrotropin receptor causes thyroiditis and allows production of monoclonal antibodies recognizing the native receptor. *J. Immunol.* 1998, 160, 1458-1465.
29. Costagliola, S., Franssen, J.D., Bonomi, M., Urizar, E., Willnich, M., Bergmann, A., Vassart, G., Generation of a mouse monoclonal TSH receptor antibody with stimulating activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 299, 891-896.
30. Takatsuka, S., Sekiguchi, A., Tokunaga, M., Fujimoto, A., Chiba, J., Generation of a panel of monoclonal antibodies against atypical chemokine receptor CCX-CKR by DNA immunization. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2011, 63, 250-257.

31. Øynebråten, I., Løvås, T.O., Thompson, K., Bogen, B., Generation of antibody-producing hybridomas following one single immunization with a targeted DNA vaccine. *Scand. J. Immunol.* 2012, 75, 379-388.
32. Tan, G.S., Krammer, F., Eggink, D., Kongchanagul, A., Moran, T.M., Palese, P., A pan-H1 anti-hemagglutinin monoclonal antibody with potent broad-spectrum efficacy in vivo. *J. Virol.* 2012, 86, 6179-6188.
33. Shabani, M., Hemmati, S., Hadavi, R., Amirghofran, Z., Jeddi-Tehrani, M., Rabbani, H., Shokri, F., Optimization of Gene Transfection in Murine Myeloma Cell Lines using Different Transfection Reagents. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2010, 2(3) 123-130.
34. Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., Gloriam, D.E., Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov.* 2017, 12, 829-842.
35. Ju, M.S., Jung, S.T., Antigen Design for Successful Isolation of Highly Challenging Therapeutic Anti-GPCR Antibodies. *Int J Mol Sci.* 2020, 21, 8240.
36. Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., Overington, J.P., A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 2017, 1, 19-34.

37. Wu, J., Xie, N., Zhao, X., Nice, E.C., Huang, C., Dissection of aberrant GPCR signaling in tumorigenesis--a systems biology approach. *Cancer Genomics Proteomics*. 2012, 9(1), 37-50.
38. New, D.C., Wong, Y.H., Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *J Mol Signal*. 2007, 2, 2.
39. Schöneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Römpler, H., Sangkuhl, K., Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther*. 2004 104(3), 173-206.
40. Smits, G., Olatunbosun, O., Delbaere, A., Pierson, R., Vassart, G., Costagliola, S., Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *N Engl J Med*. 2003, 349(8), 760-766.
41. Parma, J., Duprez, L., Van Sande, J., Cochaux, P., Gervy, C., Mockel, J., Dumont, J., Vassart, G., Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature*. 1993, 365(6447), 649-651.
42. Stoupa, A., Chaabane, R., Guériou, M., Raynaud-Ravni, C., Nitschke, P., Bole-Feysot, C., Mnif, M., Ammar Keskes, L., Hachicha, M., Belguith, N., Polak, M., Carré, A.. Thyroid hypoplasia in congenital hypothyroidism associated with thyroid peroxidase mutations. *Thyroid*. 2018, 28(7), 941-944.

43. Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R.K., Doré, A.S., Jazayeri, A., Cooke, R.M., Weir, M., Marshall, F.H., Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature*. 2013, 7459, 438-43.
44. Perrin, M.H., Vale, W.W., Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci*. 1999, 885, 312-28.
45. Hilger, D., Masureel, M., Kobilka, B.K., Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2018, 25, 4-12.
46. 橋村 大, 受容体タンパク質特異的抗体作製をめざした組換え技術の構築, 三重大学工学部卒業論文、2012
47. Stocker, J.W., Forster, H.K., Miggiano, V., Stahli, C., Staiger, G., Takacs, B., Stachein, T., Generation of two new myeloma cell lines 'PAI' and 'PAI-O' for hybridoma production. *Res. Discl.*, 1982, 217, 155-157.
48. Rems, L., Ušaj, M., Kandušer, M., Reberšek, M., Miklavčič, D., Pucihar, G., Cell electrofusion using nanosecond electric pulses. *Sci Rep*. 2013, 3, 3382.
49. Teissie, J., Golzio, M., Rols, M.P., Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of ?) knowledge. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1724(3), 270-80.

50. Arshad, H., Patel, Z., Mehrabian, M., Bourkas, M.E.C., Al-Azzawi, Z.A.M., Schmitt-Ulms, G., Watts, J.C., The aminoglycoside G418 hinders de novo prion infection in cultured cells. *J Biol Chem.* 2021, 297(3), 101073.
51. Kaneda, Y., Nakajima, T., Nishikawa, T., Yamamoto, S., Ikegami, H., Suzuki, N., Nakamura, H., Morishita, R., Kotani, H., Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol Ther.* 2002, 6(2), 219-26.
52. Nagata, S., Salvatore, G., Pastan, I., DNA immunization followed by a single boost with cells: a protein-free immunization protocol for production of monoclonal antibodies against the native form of membrane proteins. *J. Immunol. Methods* 2003, 280, 59-72.
53. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227, 680-685
54. Carles-Kinch, K., Kilpatrick, K.E., Stewart, J.C., Kinch, M.S., Antibody targeting of the EphA2 tyrosine kinase inhibits malignant cell behavior. *Cancer Res.*, 2002, 62, 2840-2847
55. Hober, S., Nord, K., Linhult, M., Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007, 848(1), 40-47.
56. Search CHO-K1 GenBank <https://chogenome.org/GenBankSearch.php> , 2021 (accessed 15 January 2021).

57. Yu, J., Song, Y., Tian, W., How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *J. Hematol. Oncol.* 2020, 13, 45.
58. Thomas, A., Teicher, B.A., Hassan, R., Antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Lancet Oncol.* 2016, 17, e254-e262.
59. Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science.* 2005, 310(5753), 1510-2.
60. Pollice, A.A., Jr McCoy, J.P., Shackney, S.E., Smith, C.A., Agarwal, J., Burnolt, D.R., Janocko, L.E., Hornicek, F.J., Singh, S.G., Hartsock, R.J., Sequential paraformaldehyde and methanol fixation for simultaneous flow cytometric analysis of DNA, cell surface proteins, and intracellular proteins. *Cytometry*, 1992, 13, 432-444.
61. Stewart, J.C., Villasmil, M.L., Frampton, M.W., Changes in fluorescence intensity of selected leukocyte surface markers following fixation. *Cytometry*, 2007, 71, 379-385.
62. Schneider, E.H., Seifert, R., Sf9 cells: a versatile model system to investigate the pharmacological properties of G protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.*, 2010, 128, 387-418.
63. 森 貴昭, 巨大リポソームへのシグナル伝達タンパク質の再構成と可視化・機能評価, 三重大学大学院工学研究科博士前期課程修士論文, 2014

64. Geisler, C., Jarvis, D.L., Identification of genes encoding N-glycan processing beta-N-acetylglucosaminidases in *Trichoplusia ni* and *Bombyx mori*: Implications for glycoengineering of baculovirus expression systems. *Biotechnol. Prog.*, 2010, 26, 34-44.
65. Pioszak, A.A., Parker, N.R., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 32900-32912.
66. Wang, X.D., Chen, Y., Wolf, M., Wagner, K.V., Liebl, C., Scharf, S.H., Harbich, D., Mayer, B., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J.M., Baram, T.Z., Müller, M.B., Schmidt, M.V., Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling. *Neurobiol Dis.* 2011, 42, 300-310.
67. Wang, X.D., Labermaier, C., Holsboer, F., Wurst, W., Deussing, J.M., Müller, M.B., Schmidt, M.V., Early-life stress-induced anxiety-related behavior in adult mice partially requires forebrain corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Eur J Neurosci.* 2012, 36, 2360-2367.
68. Grace, C.R., Perrin, M.H., Gulyas, J., Rivier, J.E., Vale, W.W., Riek, R., NMR structure of the first extracellular domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (ECD1-CRF-R1) complexed with a high affinity agonist. *J Biol Chem.* 2010, 285, 38580-38589.

69. Schmidlin, H., Diehl, S.A., Blom, B., New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends Immunol.* 2009, 30, 277-285.
70. Tangye, S.G., Tarlinton, D.M., Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur. J. Immunol.* 2009, 39, 2065-2075.
71. Nicholson, L.B., The immune system. *Essays Biochem.* 2016, 60, 275-301.
72. Yatim, K.M., Lakkis, F.G., A brief journey through the immune system. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2015, 10. 1274-1281.
73. NCBI (National Center for Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> , 2021 (accessed 15 January 2021) .
74. SignalP4.1Server. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> , 2021 (accessed 15 January 2021) .
75. UniProt. <http://www.uniprot.org/> , 2021 (accessed 15 January 2021).
76. BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool). http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome , 2020 (accessed 15 January 2021).
77. Perrin, M.H., Fischer, W.H., Kunitake, K.S., Craig, A.G., Koerber, S.C., Cervini, L.A., Rivier, J.E., Groppe, J.C., Greenwald, J., Nielsen, S.M., Vale W.W., Expression,

purification, and characterization of a soluble form of the first extracellular domain of the human type 1 corticotropin releasing factor receptor. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276, 31528-31534.

78. Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H., Vale W.W., Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 8967-8971.

79. Vita, N., Laurent, P., Lefort, S., Chalon, P., Lelias, J.M., Kaghad, M., Fur, G.L., Caput, D., Ferrara P., Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors. *FEBS. Lett.*, 1993,335, 1-5.

80. BepiPred-2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/> , 2021 (accessed 15 September 2021).

81. PDB (Protein data bank) <https://www.rcsb.org/> , 2021 (accessed 27 November 2021)

第9章 本研究における論文および学会発表リスト

9.1 学位論文

- Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
Class-switching of B lymphocytes by DNA and cell immunization for stereospecific monoclonal antibodies against native GPCR. *Immuno*, **1**(4) (2021) 432-441.
<https://doi.org/10.3390/immuno1040031>
(第2章および第3章)
- Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
Conformation-specific monoclonal antibodies recognizing the native structure of G protein-coupled receptor (GPCR). *Int. Immunopharmacol.* **98** (2021) 107872.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107872>
(第4章)

9.2 参考論文

- Yasuhiro Yamasaki, Chiho Miyamae, Yushi Isozaki, Keisuke Ichikawa, Yoshiki Kaneko, Yasuyuki Oda, Takashi Murayama, Takashi Sakurai, Katsuyuki Tamai, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
Optimization of stereospecific targeting technique for selective production of monoclonal antibodies against native ephrin type-A receptor 2. *J. Immunol. Methods* **484-485** (2020) 112813. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112813>

9.3 総説

- ・ Kanta Tsumoto, Yushi Isozaki, Hisanori Yagami, Masahiro Tomita
Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy* (Special Report) **11** (2) (2019) 119-127. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0130>

9.4 英語本

- ・ Kanta Tsumoto, Yushi Isozaki, Masahiro Tomita, M.
25.6 Production of monoclonal antibodies, In : R.I. Freshney (Ed.), *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 7th. Edition, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, U.S.A. 2016, pp. 544-545 (25. Supplementary Material, pp.102-113).

9.5 その他

- ・ 磯崎 勇志
「SST 法に基づく立体構造認識モノクローナル抗体作製法の開発と次世代抗体医薬への応用」
BB Chubu 第8号 pp. 11-14 (2015年10月号) (飛翔賞に基づく依頼執筆)
日本生物工学会 中部支部

9.6 学会賞

- ・ 優秀発表賞 第二回オンラインセミナー
「生体膜タンパク質特異的モノクローナル抗体の効率的作製」
(2020年8月22日)
生物工学会若手研究者の集い(若手会)

- ・ 支部長賞
 「細胞膜タンパク質に対する立体構造認識モノクローナル抗体の作製とその評価」
 (2019年8月6日)
 日本生物工学会 中部支部

- ・ 飛翔賞 第4回 生物工学学生優秀賞
 「SST法に基づく立体構造認識モノクローナル抗体作製法の開発と次世代抗体医薬への応用」
 (2015年10月26日)
 日本生物工学会

9.7 トピック集

- ・ 第71回日本生物工学会大会トピックス集
 「天然構造特異的認識モノクローナル抗体の作製とその評価」
 pp. 21-22
 (2019年9月)
 日本生物工学会

9.8 学会発表

9.8.1 国際学会 (13件)

- ・ Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
 「New production of native structure-specific monoclonal antibodies against G protein-coupled receptors (GPCRs)」
 8th Japan-China Nanomedicine Symposium

(June 11-12, 2021, Online)

- Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
「 Production of conformation-specific monoclonal antibodies against intact receptors」
The 10th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU
(September 24, 2020, Online)
- Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
「 Challenge to highly efficient production of stereospecific monoclonal antibodies」
13th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2019)
(December 4-6, 2019, Hyogo)
- Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
「 Selective production of stereospecific monoclonal antibodies against intact proteins」
The 9th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU
(September 25, 2019, Mie)
- Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
「 Efficient production of stereospecific monoclonal antibodies against native receptors」
12th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2018)
(December 6-8, 2018, Yamaguchi)

- Yushi Isozaki, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita

「An advanced technology for selectively generating stereospecific monoclonal antibodies against GPCRs」

11th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2017)
(December 13-15, 2017, Miyagi)
- Yushi Isozaki, Hiroki Miura, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita

「Production of stereospecific monoclonal antibody against GPCR」

The 7th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU
(September 27, 2017, Mie)
- Yushi Isozaki, Hiroki Miura, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita

「Advanced hybridoma technology for stereospecific monoclonal antibodies as a next therapeutic medicine」

10th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016)
(November 24-26, 2016, Ibaraki)
- Yushi Isozaki, Hiroki Miura, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita

「Stereospecific monoclonal antibodies as a new therapeutic medicine」

The 6th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU
(September 27, 2016, Mie)
- Y. Isozaki, C. Miyamae, K. Tsumoto, M. Tomita.

「Anti-GPCR monoclonal antibodies as novel antibody medicines」

9th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2015)

(December 10-12, 2015, Mie)

- Yushi Isozaki, Chiho Miyamae, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
「Efficient production of stereospecific anti-GPCR monoclonal antibodies」
The 5th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU
(September 29, 2015, Mie)
- Yushi Isozaki, Yasuhiro Yamasaki, Chiho Miyamae, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita.
「Next generation of hybridoma technology for selective production of receptor-specific conformational monoclonal antibodies」
The 4th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU
(September 17, 2014, Mie)
- Yushi Isozaki, Yasuhiro Yamasaki, Miyata Keizo, Kato Fuminori, Kanta Tsumoto, Masahiro Tomita
「Selective production of stereospecific monoclonal antibodies directed against GPCR」
The 3th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU
(Dec. 3rd, 2013. Mie)

9.8.2 国内学会

31 件 (2013 年－2021 年)