

# ニュース98号

2014. 1 発行

公益財団法人 岡山工学振興会編

E-mail: ofst@cc.okayama-u.ac.jp

HP: <http://www1a.biglobe.ne.jp/ofst/>

## 変異能力を有したB細胞を用いた革新的なヒト型抗体作製技術の開発と抗体医薬創薬への応用

岡山大学大学院自然科学研究科 准教授 金山 直樹

### はじめに

近年、抗体の標的に対する高い結合特異性を利用して、癌、自己免疫疾患、感染症などの難治性疾患の治療薬（いわゆる抗体医薬）として応用が進んでいる。このため、抗体医薬のシーズとなるモノクローナル抗体を取得する技術および取得した抗体の標的に対する特異性や親和性を向上させる技術の重要性は増している。生体内では免疫後、効率よく高親和性抗体が生み出される。この過程は親和性成熟と呼ばれ、抗原特異的B細胞の抗体可変部遺伝子に高頻度に突然変異が導入され、多様化したB細胞集団の中から高親和性抗体を産生するB細胞のみが厳密に選択されることにより進行する。この巧妙な分子進化システムを *in vitro* 培養系で実現できれば、1) *in vitro* で迅速に抗体のスクリーニングが行えること、2) システム自身が高頻度変異機能を内包し、抗体遺伝子の変異と選択による親和性成熟が行えること、3) 抗体ライブラリーの形成時に免疫寛容の制限が加わらないこと、などの条件をみたした理想的な抗体作製技術を構築できると考えられる。我々は、これまでに生体内の抗体産生システムの詳細を明らかにするとともに、生体内のシステムを模倣して培養B細胞集団を抗体ライブラリーとして利用する抗体作製技術を開発してきた。本研究では、本技術を、さまざまなヒト型抗体を作製できるように拡張する。

### ニワトリB細胞株DT40を用いた抗体作製技術

ニワトリB細胞株DT40は、次のような優れた性質を持っている：1) 培養中に抗体遺伝子に変異を高頻度に導入し、多様な抗体ライブラリーを形成できる；2) IgM抗体を細胞表面に発現するとともに、分泌している；3) 外来遺伝子を導入すると、動物細胞としては例外的に高い頻度で相同組換えされるので、遺伝子のノックアウトや特定部位への外来遺伝子の挿入による細胞機能の改変が容易に行える；4) 細胞増殖が非常に早いので細胞の育種やクローン選択が迅速に行える。DT40細胞は抗体遺伝子への変異導入に必須のタンパクであるAID (activation-induced cytidine deaminase)を発現しており、培養中にAID依存的に抗体V遺伝子を多様化し続ける。我々は変異導入に必須のAIDの発現を可逆的にON/OFF制御できる仕組みを導入した細胞株DT40-SWを樹立し、この細胞株を用いた抗体作製システムを構築した(図1)。DT40-SW細胞をAID-ONの状態ですべて連続的に大量培養することにより多様な抗体を発現する細胞ライブラリーを作製する。この細胞集団(約 $10^8$ 個)に抗原を結合した磁気マイクロビーズを反応させ、磁気ビーズの結合した

細胞を磁石により分離する、あるいは蛍光標識した抗原を結合した細胞をセルソーターによって単離することにより目的の抗体を産生する抗体を単離する。単離されたクローンを培養し、分泌された抗体を ELISA で定量したり、細胞表面に発現する抗体を FACS で評価したりすることにより産生抗体の特異性を確認する操作は約 2 週間で完了する。一次スクリーニングで十分な親和性の抗体が得られなくても、さらに培養を続けて変異導入と選択を繰り返すことにより、親和性成熟の原理に基づいて、高親和性抗体が得られる。最終的に得られたクローンは AID を OFF にすることにより変異を停止させ、その形質を安定化させることができる。

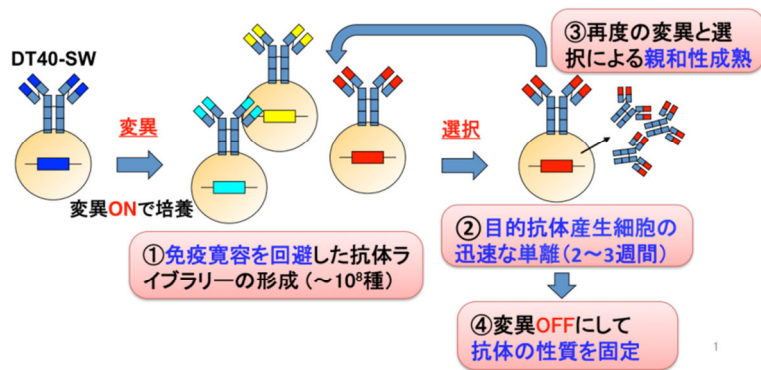


図1 ニワトリB細胞株DT40を用いた*in vitro*抗体作製システム

図1 ニワトリB細胞株DT40を用いた*in vitro*抗体作製システム

### DT40を用いたヒト型抗体作製

DT40 が産生する抗体はニワトリ IgM であるが、医薬の候補抗体の探索に応用する場合、*in vivo* および *in vitro* のヒト抗体評価系に直接用いることができるように定常部がヒト IgG 型として抗体を取得できる方が、多数の候補抗体を評価する上で都合が良い。我々は、DT40 の抗体重鎖・軽鎖定常部遺伝子を、それぞれヒト IgG1 重鎖・κ 軽鎖定常部遺伝子に相同組換により置換し、細胞株 DT40-SW-hg を樹立した(図2)。DT40-SW-hg は、可変部がニワトリ由来、定常部がヒト IgG1 κ のキメラ抗体を細胞表面および培養上清に発現することから、標的特異的なクローンの取得は細胞表面に発現する抗体で、抗体の評価は分泌抗体を用いて行うことができる。この細胞株の変異能力を ON にして培養すると、親株である DT40-SW と同等あるいはそれ以上の抗体への変異が見られ、一定期間培養した細胞集団は様々な特異性を有した抗体が含まれる抗体ライブラリーとなることが期待される。このライブラリーからモデル抗原に特異的なヒトキメラ抗体を取得することに成功している。

一方、DT40 の変異能力が抗体遺伝子座に組み込んだ外来遺伝子対しても有効であることを見いだしている。この知見を基に、様々な従来技術によって得られたモノクローナル抗体遺伝子を、DT40 に組み込んでその変異能力により改変する技術を開発している。この方法では、DT40-SW のニワトリ抗体可変部遺伝子を、改変したいモノクローナル抗体の可変部遺伝子に置換し、変異機能を ON にして培養することにより、外来抗体可変部遺伝子に変異を導入できる。すなわち、変異と選択の繰り返しにより、外部から導入した任意の抗体の機能改良が可能である。ヒト型の抗体定常部を発現する DT40-SW-hg にヒトモノクローナル抗体の可変部を導入すると、DT40 に完全にヒト型の抗体を発現させることができる(図2)。いくつかの抗体医薬をモデルとしたヒトモノクローナル抗体を発現させ、DT40 の変異能力によって改良することに成功

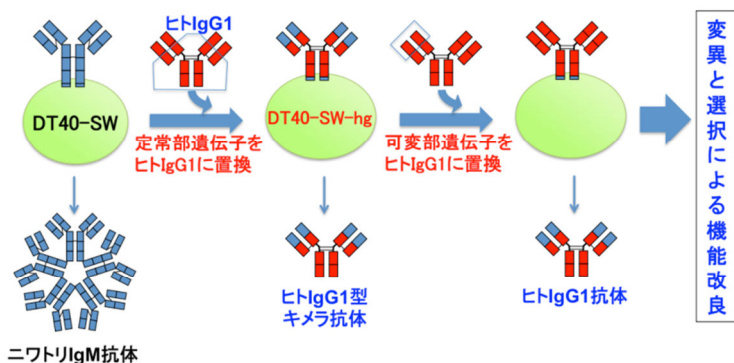


図2 ヒトIgG1抗体産生型DT40-SWの樹立と抗体作製への応用

している。

## 今後の展開

様々な方法で取得された既存の抗体を親和性成熟できることや、ヒト型抗体を扱えることは、DT40が有用な活性を有した抗体を開発するための新規なプラットフォームとしての利点であると考えられる。また、DT40の高い増殖性により目的クローンの単離と評価を簡便かつ効率的に行えるので、標的に対する抗体探索をハイスループットに行うことができる。本稿では省略したが、関連遺伝子を操作して抗体産生能力や変異導入能力を増強することも可能である。今後、生体内の抗体産生システムの他の特徴(親和性だけでなく安定性が高い抗体が産生される、など)を取り入れて技術を改良するとともに、抗体医薬の候補探索への本技術の応用を進めて行く予定である。

このたび、内山勇三科学技術賞にご採択いただき有り難うございます。内山工業様はじめ選考委員会の先生方、関係各位の皆様方に厚く御礼申し上げます。

「平成 25 年度特別研究（内山勇三科学技術賞）受賞者」

## 《事務局よりお知らせ》

### 学術研究集会、学術講演会への助成について

第 1 回（平成 26 年 4 月～6 月開催） 平成 26 年 2 月 14 日（金）申請締切り

※ 平成 26 年度公募要項は財団ニュース 3 月号に掲載します。

### ほっと交流会

日時：平成26年3月13日（木）18：00～ 講師：岡山大学名誉教授 古賀 隆治

場所：岡山大学新技術研究センター1F

参加費（軽食付）：賛助会員：1,000円、非会員：1,500円

## 賛助会員様のご紹介

(公財)岡山工学振興会は、理工学に関する研究を振興するとともに、先端技術の向上を目指した大学と産業界等との連携をはかり、もって学術および技術開発の進展に寄与することを目的としています。8月号より、この趣旨に賛同し、ご支援賜っています法人会員様をご紹介します。今月号は、(株)システムズナカシマ様にご執筆を賜りました。

### ◆賛助会員の特典

- 1 研究課題および研究者についての各種の情報（最新の研究年報等）が提供されます。
  - 2 講演会、セミナーに参加できます。  
国の内外から第一線の研究者を招き、理工学分野で話題となるトピックスについての講演会やセミナーを開催します。  
「バイオテクノロジー」「ネットワーク技術」「ナノテクノロジー」「高速デジタル技術」など、先端技術の研究成果と今後の展望について、研究者の生の声をお伝えします。
  - 3 各種学会が開催するセミナーあるいは特定分野における短期の技術者養成を行える研究室などを紹介し、若手技術者の養成を援助します。
  - 4 技術相談のお世話をします。工学的な立場からのアドバイスを希望されるときには、その相談に応じます。
  - 5 産学交流に協力できます。共同研究、委託研究等についても、緻密な人的ネットワークを駆使して適切な研究者を紹介します。
- 上記の他、賛助会員に有意義な事業の企画について、各位からご提言賜れば幸いです。

㈱システムズナカシマは、岡山県に本社を置く ICT 企業です。

### 【起業】

船用プロペラのトップメーカーであるナカシマプロペラ㈱の新規事業として、1985年に起業しました。パソコンで稼働する2次元CADシステム「ANDES」を開発して、それを販売し始めたことを起源としています。

当社の業務は、ナカシマプロペラグループの情報部門であるとともに、CAD/CAM、GIS、Webシステム、RFID等の技術を生かしたパッケージソフトの開発と販売、ならびに業務用受託開発等を含む提案型の営業/開発/運用までトータルサポートを行っています。

当社は、社員110名ほどの地方企業ですが、東京をはじめ全国7ヶ所に拠点をもち活動しています。



### 【商品】

#### 2次元CADシステム「ANDES」



現在「ANDES」は、電気、水道設備等の業種向け専用システムを提供しており、なかでも給排水申請用CADシステム「水道Master」は、業界シェア No.1 にまで成長しました。

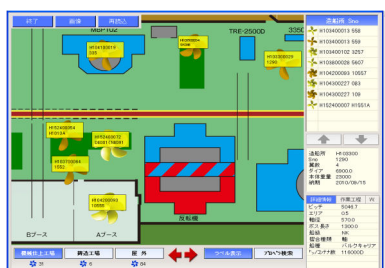
#### 営業情報管理システム「NICE 営業物語」

営業担当者が日々作成する日報を活用して、経営者や管理職の方がリアルタイムな売り上げ情報を一目で把握できるWebアプリケーションです。クラウド、スマートデバイス対応して、進化し続けております。



### 【ソリューション提供】

#### 製造業向け生産管理システム等



ナカシマプロペラをはじめ、地元製造業における各種業務システムを構築して、効率よく高品質な生産活動の支援をさせていただきます。



## 【物流／店舗向け】

今では、交通カード、電子マネー等身近で利用されていますが、RF タグを利用したソリューションを黎明期から流通過程および店舗での商品管理、紹介サービスとして提供しています。

その他、この RF タグや 2D コード等の自動認識技術を利用したシステムを提供しております。



## 【教育向け】



ブロードバンドスクールコンソーシアムの唯一のシステムベンダーとして学校の ICT 環境の構築と支援を行い、岡山デジタルミュージアム（現：岡山シティミュージアム）のメイン展示である情報宝庫をシステム化して、児童、生徒に ICT の活用支援を行っております。

システムズナカシマは、「お客様の要望に応える世界でただひとつの最適なプロペラを作ってきたことに由来する “We Go Beyond” というナカシマグループのブランドスローガン」の下、お客様の多様な要望に的確にこたえ、新たな最適解を追い求め、お客様とともにその向こう側（Beyond）にある無限の可能性をカタチにしてゆきます。

連絡先：〒700-0982 岡山市北区中島田町 2 丁目 3-19 株式会社 システムズナカシマ 岡山支店  
086-234-8111 <http://www.systems.nakashima.co.jp/>

## 《（公財）岡山工学振興会賛助会員の募集について》

（公財）岡山工学振興会は、平成元年 2 月 3 日に設立された特定公益増進法人です。本財団は、理工学に関する研究を振興するとともに、先端技術の向上を目指した大学と産業界等との連携をはかり、もって学術および技術開発の進展に寄与することを目的としています。

本会の趣旨にご賛同のうえ、是非とも賛助会員をお引き受け頂き、ご支援賜りたくお願い申し上げます。

### ◆ 申し込み手続き ◆

1 （公財）岡山工学振興会事務局までご連絡いただければ、「賛助会員申込書」をご送付します。

2 賛助会費（年額） (1)法人会員 1 口 50,000 円 1 口以上

(2)個人会員 1 口 5,000 円 1 口以上

### ◆ 賛助会員の特典 ◆

1 研究課題および研究者についての各種の情報（最新の研究年報等）が提供されます。

2 講演会、セミナーに参加できます。

3 各種学会が開催するセミナーあるいは特定分野における短期の技術者養成を行える研究室などを紹介し、若手技術者の養成を援助します。

4 技術相談のお世話をします。工学的な立場からのアドバイスを希望されるときには、その相談に応じます。

5 産学交流に協力できます。

※詳しくは当財団ホームページ <http://www1a.biglobe.ne.jp/ofst/> をご覧ください。

等々

## 学術交流推進事業公募

### 1. 目的

この助成は、岡山県内における理工学に関する学術ならびに先端技術の向上を目指した優れた学術研究および学術集会開催等を助成し、その振興を図ることにより、岡山県における科学技術の発展に寄与することを目的としている。

2. 研究助成等の対象 理工系の基礎及び応用研究または、これらに関わる学術集会等。

### 3. 研究助成等の種目

(1) 学術研究推進助成 特色ある成果を挙げている研究者等がさらに高水準を目指して取り組む、学術的あるいは先端技術に関する研究。

(2) 学術集会開催推進助成 岡山県内の理工学の発展と先端技術の向上に寄与する学術集会、学術講演会。

4. 研究助成等の費用 学術研究推進助成等申請書の研究内容等に賛同する企業等の寄附金をもって充てる。

5. 研究助成件数及び金額 概ね 30 件程度 (1 件 1 万円以上)

### 6. 研究助成の申請

(1) 応募資格 理工学分野の基礎及び応用研究に従事している研究者または研究グループで岡山県下の大学、高専等教育研究機関に所属する者。

(2) 申請手続 申請者は研究の目的、性格、必要性等を十分に考慮し、学術研究推進助成申請書(様式1-1)を、または学術集会開催推進助成申請書(様式1-2)を作成し下記8に郵送またはメールで提出してください。

(3) 申請書類 申請用紙は当財団のホームページからダウンロードできます。また、財団事務局に請求くだされば、電子データの様式を差し上げます。

(4) 受付開始 平成 25 年 4 月 1 日から

7. 提出期限 **毎月月末**

8. 提出先・お問い合わせ先 〒700-8530 岡山市北区津島中三丁目1番1号

公益財団法人 岡山工学振興会事務局

Tel・Fax : (086) 255-8311

E-mail: ofst@cc.okayama-u.ac.jp,

URL: <http://www1a.biglobe.ne.jp/ofst/>

### 9. 選考結果

選考委員会で選考(審査)し、申請者及び寄附者に採否、助成金額、交付期日等を通知する。

### 10. 研究・集会終了後の手続

助成期間終了後1年以内に学術研究推進助成実績報告書(研究継続中の場合は中間報告書)(様式5)または学術集会終了報告書(様式6)を提出して下さい。

11. 研究成果等の公表 財団HPにおいて公表する。