

学位論文の要旨

氏 名	村岡 賢
学位論文題目	成人T細胞白血病細胞を標的化するヒト抗体に関する研究

本論文は、成人T細胞白血病を標的化するヒト一本鎖抗体の探索を行い単離した抗体の性状解析を行ったことについてまとめたものである。以下の5章から本論文は成り立っている。

第一章では、成人T細胞白血病(ATL)を示し、ATL治療の現状及び戦略について述べた。ATLはCD4陽性T細胞に由来した、極めて悪性度の高い白血病である。ATLは既存の抗がん剤に対して抵抗性で、一旦発症すると、患者は平均1年程度で死に至る。このような現状から未だ、有効な治療薬の開発されていないことより早急な開発が待たれている。

第二章では、scFvファージディスプレイについて述べた。1975年、Koller,J.とMilstein,C.が細胞融合法によりマウスのモノクローナル抗体を産生させるハイブリドーマ技術が確立されて4半世紀を経て、抗体医薬は、癌、アレルギー、感染症などの疾患領域における新たな医薬品として今日最も注目を集めている。その背景には、実用化における最大の障害、マウス由来のモノクローナル抗体のヒトに対する免疫原性の解決に向けた近年の技術進歩がある。その技術として、ヒト抗体遺伝子をマウスに移植したトランスクロモマウスとヒト抗体ファージディスプレイライブラリが報告されている。本研究では、20名の健常人由来の抹消血リンパ球をもとに構築されたヒトscFvファージライブラリを用いている。

第三章では、ATL患者由来の細胞株S1T細胞に特異的に結合する抗体の単離について述べた。S1T細胞に特異的に結合する抗体分子を単離するために、scFvファージライブラリとセルソータを組み合わせた手法で選別を行った。一種類のS1T細胞に特異的に結合する抗体分子の単離に成功した。さらに、この抗体の性状について解析した。単離した抗体は、S1T細胞を特異的に細胞死を誘導することが分かった。この抗体がHLA-DR分子の β 鎖を認識し細胞死を誘導することが示された。細胞死を誘導している抗体分子の形態がdimer form(diabody)であることが示された。以上の結果より、単離した抗体はdimer formにて細胞死を誘導することが示された。

第四章では、ATL細胞特異的発現分子CD70に結合する抗体の単離と性状解析について述べた。ATL細胞にCD70が高発現していることが示された。CD70に特異的に結合する抗体分子を単離するために、リコンビナントCD70蛋白を用いたプレートパニングと細胞を用いたセルパニングを組み合わせた手法で選別を行った。一種類のCD70に特異的に結合する抗体分子の単離に成功した。この抗体では細胞死を誘導することができなかったことが示された。以上の結果より、CD70に特異的に結合する抗体分子の単離に成功したが、細胞死などの副作用を示すことは無かった。今後は、抗体エンジニアリングによりこの抗体を応用していく。

第五章では、以上の結果を総括し、ATLの治療薬の開発における展望及び残された課題について述べた。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第296号	氏名	村岡 賢
審査委員	主査	伊東 祐二	
	副査	大木 章	杉村 和久

学位論文題目

成人T細胞白血病細胞を標的化するヒト抗体に関する研究

(A study for human antibodies targeting adult T cell leukemia cells)

審査要旨

提出された学位論文および論文目録等をもとに学位論文審査を実施した。本論文は、成人T細胞白血病を標的化するヒト一本鎖抗体 (scFv) の探索を行い、単離した抗体の性状解析を行ったものである。以下の5章から本論文は構成されており、各章の内容は以下の通りである。

第一章では、本論文の序論として成人T細胞白血病(ATL)の発症機構について詳述し、ATL治療の現状及び戦略について述べた。ATLはCD4陽性T細胞に由来する極めて悪性度の高い白血病である。ATLは既存の抗がん剤に対して高い抵抗性を示し、一旦発症すると患者は平均1年程度で死に至る。このような現状にもかかわらず、有効な治療薬の開発されておらず早急な治療薬開発が待たれている。

第二章では、本研究で、ヒト抗体を単離するために用いたscFvファージディスプレイについて詳述した。抗体医薬は、癌、アレルギー、感染症などの疾患領域における新たな医薬品として今日最も注目を集めているが、その開発法として、現在重要な手法となっているのが、ヒト抗体遺伝子をマウスに移植したトランスクロモマウス法とヒト抗体ファージディスプレイライブラリ法である。本研究では、ファージディスプレイライブラリ法を用いており、その原理、ライブラリ構築法、そのメリットについて述べた。

第三章では、ATL患者由来の細胞株S1T細胞に特異的に結合する抗体の単離とその性質について述べた。S1T細胞は、ATLの患者由来のガン細胞であり、これに特異的に結合する抗体分子を先の抗体ファージライブラリを用いて行った。迅速に抗体を単離するためセルソータを用いた方法を考案し、ATL細胞に特異的に結合する抗体分子の単離に成功した。さらに、この抗体の性状について解析した結果、単離した抗体は、S1T細胞に対して強力な細胞死を誘導することが分かった。この抗体がHLA-DR分子のβ鎖を認識し、また2量体構造 (dimer form, diabody)が、細胞死誘導に必須であることを明らかにした。

第四章では、ATL細胞特異的発現分子CD70に結合する抗体の単離と性状解析について述べた。ATL細胞にCD70が高発現していることが共同研究者らにより明らかにされたことから、抗体ファージライブラリを用いて、CD70に特異的に結合する抗体分子を単離した。組み換え型CD70タンパク質を用いたプレートパンニングと細胞を用いたセルパンニングを組み合わせた手法で選別を行い、特異的抗体分子の単離に成功した。この抗体では単独では細胞死を誘導することができなかったが、抗体エンジンアリングにより改良で、エフェクター機能を有する抗体作成へと応用できることを示唆した。

第五章では、以上の結果を総括し、ATLの治療薬の開発における展望及び残された課題について述べた。

以上のように、本論文は、成人T細胞白血病における有効な抗体医薬の開発を目的とし、ファージディスプレイ法、細胞パンニングの手法を用いて、ATL患者由来の細胞株S1T細胞に特異的に結合する抗体の単離に成功し、その特異的な細胞死誘導活性を見出した。この研究成果は、ATLの治療薬開発へと道を開くだけでなく、低分子化抗体医薬のデザインに対する指標を与える意味でも重要である。よって、審査委員会は学位 (博士) の学位論文として合格と判定した。

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第29号	氏名	村岡 賢
審査委員	主査	伊東 祐二	
	副査	大木 章	杉村 和久

最終試験は、以下の要領で博士論文の発表会を行い、研究発表内容の質、発表状況、質疑応答の内容を総合的に審査した。

博士論文の発表会は、平成21年2月12日の13時00分より鹿児島大学工学部共通棟403号室にて行い、30分の博士論文内容の発表後、約30分間の諮問を含む質疑応答が行われた。具体的な質疑応答の内容の一部を以下に示す。

1) 単離された抗HLA-DR β 鎖抗体の健常人のリンパ球に対する効果はどのようなものか

回答：健常人の末梢リンパ球(PBMC)と活性化PBMCに対して、単離された抗HLA-DR β 鎖抗体の結合活性を検討した。その結果、結果として、PBMC中のB最奥には反応していたが、T細胞には反応しなかった。また、活性化PBMC中のT cellにも反応しなかったことから、本抗体の免疫反応への影響は限定的と考えている。

2) 単離された抗HLA-DR β 鎖抗体のエピトープと細胞死誘導活性との関連について

回答：他の論文によりHLA-DRの α 鎖、 β 鎖に結合する抗体にはそれぞれ細胞死を誘導する作用があるという報告があります。本研究で単離された抗体はHLA-DRの β 鎖に結合して細胞死のシグナルを伝達すると考えられますが、その詳しいエピトープは検討を行っていません。

3) 細胞パンニングで苦労したポイントについて

回答：本研究では、細胞パンニングとして報告されている方法の中で、有用と思われる操作を組み合わせて、今回用いた方法を考案しました。その方法を用いて細胞パンニングを行った結果、思っていた以上に迅速かつ容易に抗体の単離に成功しました。いずれにしても、今回用いたフローサイトメータを用いるパンニング法は、細胞特異的な抗体を単離する上で極めて有用な方法と思います。

4) CD70に対する抗体の単離に、2つのパンニング法を組み合わせた理由について

回答：2008年Barbaraらの論文で報告されているように、組み換えタンパク質分子を用いてパンニングを行って得られた抗体は、組み換え抗原分子に結合するが、細胞表面に発現する抗原分子に結合しないことから、直接細胞を用いたパンニングの重要性が指摘されていました。しかし、細胞上に発現している少ない量の抗原に対しては、最初から細胞パンニングによる操作で抗体を単離することは極めて困難です。そこで、1段階目に、組み換え抗原分子を用いてパンニングを行い、ある程度幅広い特異性を持った抗体を濃縮し、2段階目で細胞パンニングに用いることで細胞上の抗原に結合する抗体の単離を行う手法の開発を考えました。

5) ELISAの検出の方法について。

回答：基質であるp-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物に、抗体に標識したアルカリフォスファターゼが働くことによりリン酸基が加水分解され、生じたp-ニトロフェノールが405nm付近に吸収を持つことから、405nmの吸光度を測定することで、結合した抗体の検出をおこなっています。

以上の内容から、3人の審査員は、審査対象者が大学院博士課程修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士(工学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。