

《様式B》

研究テーマ 「脾臓細胞からのウサギモノクローナル抗体効率取得法開発」

研究責任者 所属機関名 iBody 株式会社

官職又は役職 技術開発担当部長

氏名 加藤 晃代 メールアドレス kato.teruyo@ibody.co.jp

共同研究者 所属機関名 名古屋大学生命農学研究科

官職又は役職 講師

氏名 兒島 孝明

(平成 30 年度募集) 第 31 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000 字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

動物の免疫反応で作られるモノクローナル抗体は、特定の抗原を見分けて強く結合するタンパク質であり、ライフサイエンス研究のみならず検査診断薬および医薬品として、或いはセンサー等の工学的用途としてもそのニーズがますます高まっている。本研究では、マウスモノクローナル抗体よりも親和性・特異性ともに優れた性能を有することが知られる、ウサギモノクローナル抗体を従来よりも高効率で取得する手法の開発を目的とした。

本研究の申請者らは、これまでに、ウサギ血液中に存在する抗体産生細胞である B 細胞から迅速かつ低コストにモノクローナル抗体を作製し評価可能な「Ecobody 技術」を開発してきた。本技術は、目的抗原で免疫したウサギ由来の血液数 mL から B 細胞を 1 細胞ずつ分離し、シングル細胞から抗体遺伝子増幅、続いて無細胞タンパク質合成系による改変抗体の作製・評価をおこなうものである。これまでは、血液中 B 細胞を用いていたが、より多くの B 細胞が集積している脾臓に対して同様の技術を適用可能とすれば、より効率良く目的抗体を取得できる可能性が高まる。

そこで本研究においては、冷凍保存したウサギ脾臓細胞から Ecobody 技術によりモノクローナル抗体を取得するため、まず、免疫したウサギから脾臓を取り出し、長期保存可能な処理条件を検討した。その結果、脾臓摘出後、臓器保存液に浸し 2 日間程度冷蔵保管した状態からでも、生存細胞の分離が可能であった。その後、細胞保存液に懸濁し -80℃ 保存し、保存後 3~6 か月後の細胞を用いたフローサイトメーターによるシングル B 細胞のセクションとシングル B 細胞からの遺伝子増幅を行った。その結果、保存期間によらず、血液中 B 細胞と同等のセクションと遺伝子増幅が可能であった。以上より、長期保存した脾臓細胞からのモノクローナル抗体取得が可能であることが示された。

本研究により、長期冷凍保管したウサギの脾臓細胞からモノクローナル抗体を取得できることを明らかとした。今後は、免疫終了後のウサギ血液のみならず脾臓を一時保管し、その血清評価を経た後に、冷凍脾臓細胞から抗体探索を行うことが可能となる。これにより、有用抗体を見つけれられる可能性が拡大することが期待される。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

1. 緒言

動物の免疫反応で作られるモノクローナル抗体は、特定の抗原を見分けて強く結合するタンパク質であり、ライフサイエンス研究のみならず検査診断薬および医薬品として、或いはセンサー等の工学的用途としてもそのニーズがますます高まっている。技術的背景から、現在普及しているモノクローナル抗体の殆どがマウス由来である。昨今、低分子化合物やペプチド、ウイルス等に対する高品質なモノクローナル抗体のニーズが拡大しているが、マウスからは高い親和性と選択性を兼ね備えたモノクローナル抗体が得られにくいとされている。一方で、ウサギモノクローナル抗体は、抗体分子の重要な部位である抗原認識部位がマウスのそれと異なるため、マウスよりも 100 倍結合力の高い、優れた性能を有することが知られている。しかしながら、ウサギのモノクローナル抗体は、高性能であることが知られているものの、簡単に作製することができない。そのような背景の下、申請者らは、ウサギやヒトから得られる微量血液中のシングル B 細胞から、モノクローナル抗体を迅速に取得・評価できる Ecobody 技術を開発してきた。そこで、本研究においては、免疫したウサギから得られる脾臓からモノクローナル抗体を取得・評価するための方法確立を目指し、脾臓細胞の保管方法、長期保管の影響を検討した。

2. 実験方法と結果

2.1. ウサギの免疫と脾臓の処理方法の検討

ウサギ免疫の抗原コンジュゲートとしては、Bovine Serum Albumin (BSA) または Imject™ Maleimide-Activated Blue Carrier™ Protein (Thermo) を使用し、3~5 回免疫後のウサギから脾臓を摘出した。摘出脾臓を冷蔵保存可能とするために、市販の臓器保存液 MACS tissue solution (Miltenyi Biotec) に浸し、1-2 日間冷蔵 (4℃) で保管した。脾臓を保存液から取り出し、2%FBS 入り PBS で軽く洗い、ハサミで細かく裁断した。その後ステンレス製茶こし上で細胞をほぐすことで細胞以外の余分な組織塊を除去し、更に 250~500 μm 目開きのステンレス製或いはナイロン製メッシュで細胞を濾過し、細胞懸濁液を回収した。PBMC 分離培地 (Lymphocyte Separation Medium 1077; Promo cell) を用い、密度勾配遠心分離により、リンパ球画分を分離した。その結果、脾臓摘出後当日、翌日、翌々日のいずれにおいても 10⁷ 細胞以上の細胞を取得できることがわかった (表 1)。

表 1. ウサギ脾臓摘出処理経過時間と回収細胞数

	摘出後の経過時間	湿重量	回収できたリンパ球数
検体 1	当日	0.82 g	2.9 x 10 ⁷
	翌日	1.21 g	3.5 x 10 ⁷
検体 2	当日	0.22 g	9.5 x 10 ⁷
	翌日	0.37 g	1.0 x 10 ⁸
検体 A	翌々日	N.D.	1.3 x 10 ⁷
検体 B	翌々日	N.D.	1.3 x 10 ⁷
検体 C	翌々日	N.D.	2.1 x 10 ⁷
検体 D	翌々日	N.D.	2.0 x 10 ⁷

2.2. 細胞の冷凍保存

回収した細胞は、一般的な細胞保存液であるバンバンカー（日本ジェネティクス）または CELLBANKER 1（日本全薬工業）に $10^6 \sim 10^7$ cells/mL 程度となるよう懸濁・分注し、 -80°C にて保管した。

2.3. 冷凍保存脾臓細胞のセレクションと抗体遺伝子増幅

-80°C にて保管した約3か月、6か月および1年経過後の細胞溶液を融解し、1,000 G で遠心分離し0.1%BSA入りPBSにて再懸濁した。蛍光(Cy5)標識した抗原および蛍光(FITC)標識した抗ウサギイムノグロブリン抗体で染色し、フローサイトメーター(SONY, SH800)により陽性細胞をセレクションした(図1)。その結果、数か月~1年間程度 -80°C で保管し融解した脾臓細胞からでも問題なく目的の陽性をセレクション可能であることがわかった。そこで、それらを96 well PCR プレートまたは384 well PCR プレートにシングルセルソートした(図1中F画分)。

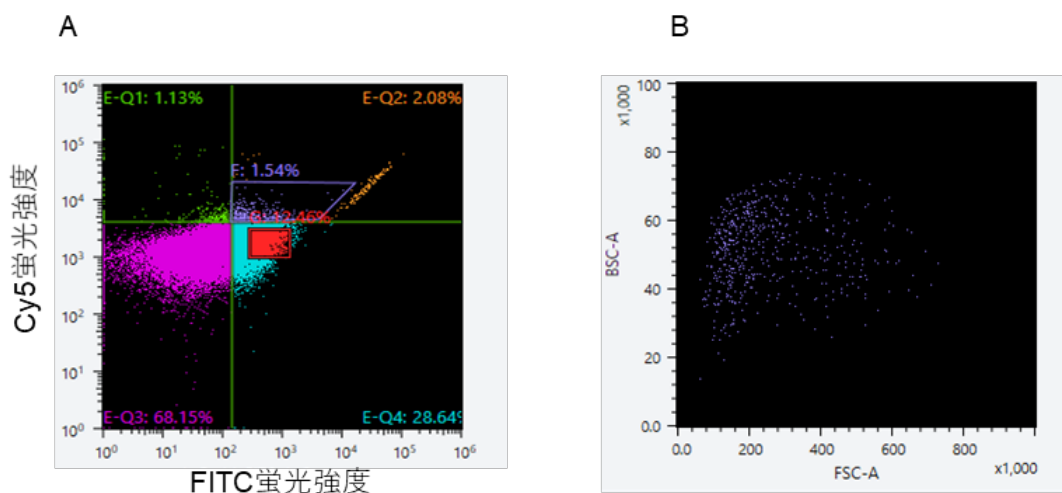


図1. フローサイトメーターにより回収した冷凍脾臓細胞の画分

A. 蛍光強度(X軸:FITC、Y軸: Cy5)を指標としたときのドットプロット.

B. AにおけるゲートFのFSCおよびBSCを指標としたときのドットプロット.

次に、シングルセルソートした細胞をもとに、1細胞由来の逆転写反応でcDNAを合成し、次いで2ステップのPCRによりウサギモノクローナル抗体のL鎖およびH鎖遺伝子を増幅した。アガロース電気泳動とエチジウムブロマイド染色により増幅DNA断片を確認したところ、その増幅効率に違いは認められたものの、保管3か月後、6か月後および1年後のサンプルいずれにおいても抗体遺伝子を増幅することができた(図2)。ただし、1年経過後のサンプルにおいては遺伝子増幅効率が低いことが明らかとなったため、6か月程度までの保管とすべきと考えられた。

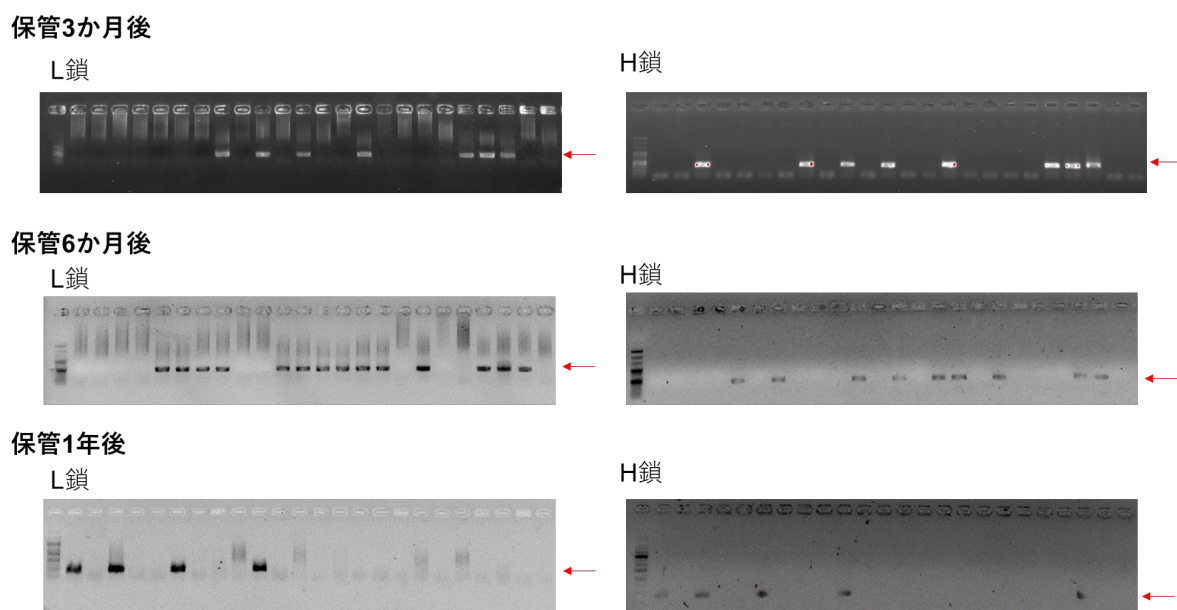


図 2. 脾臓由来シングル細胞由来モノクローナル抗体の遺伝子増幅結果
赤色の矢印は目的サイズを示す. 各ゲルの最左レーンはサイズマーカー

3. 総括

本研究では、抗原で免疫したウサギから得られる脾臓を材料として、シングルセル技術である Ecobody 技術によりウサギモノクローナル抗体を取得する方法の開発を行った。その結果、摘出後の脾臓は最低 2 日間程度冷蔵保存可能であり、問題なく B 細胞を含むリンパ球画分を回収することができた。また、その後-80℃で 3 か月～1 年月保管した細胞を使用しフローサイトメーターにより細胞をセクションし、シングル細胞からの遺伝子増幅を行ったところ、大きな問題はなく抗体遺伝子を増幅することができた。長期保管では多少効率が低くなるのがひとつの課題である。

以上より、長期冷凍保管した脾臓細胞からのウサギモノクローナル抗体の取得および評価が可能となった。今後、本技術を用いることで、免疫終了後のウサギ血液のみならず脾臓を一時保管し、その血清評価を経た後に、冷凍脾臓細胞から抗体探索を行うことが可能となる。これにより、図 3 のような流れで有用抗体を見つけられる可能性が拡大すると考えられる。

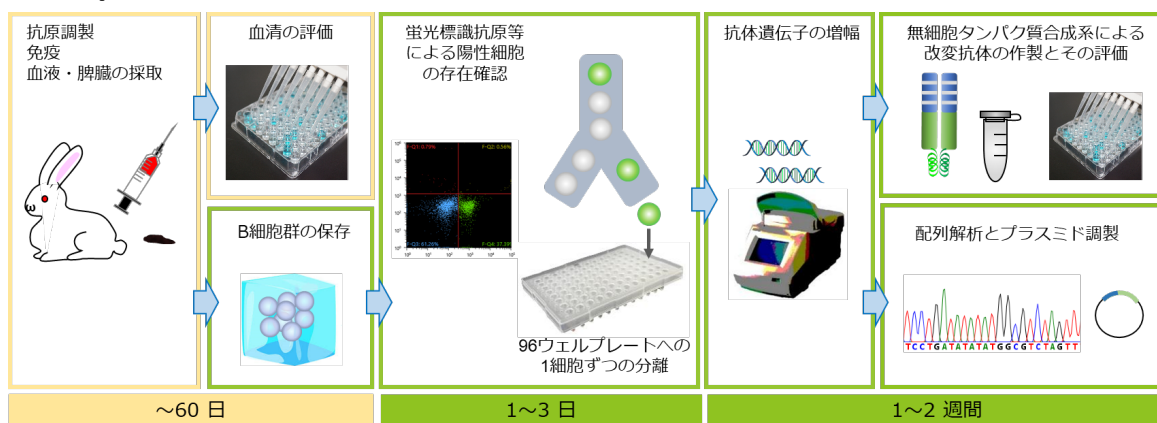


図 3. 脾臓細胞からのモノクローナル抗体取得の流れ