

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6721502号  
(P6721502)

(45) 発行日 令和2年7月15日(2020.7.15)

(24) 登録日 令和2年6月22日(2020.6.22)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
C 1 2 N 5/0781 (2010.01)	C 1 2 N 5/0781
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08
C O 7 K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18

請求項の数 12 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-516423 (P2016-516423)	(73) 特許権者 505368531 株式会社カイオム・バイオサイエンス 東京都渋谷区本町三丁目12番1号
(86) (22) 出願日 平成27年5月1日(2015.5.1)	(74) 代理人 100137512 弁理士 奥原 康司
(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/063090	(74) 代理人 100178571 弁理士 関本 澄人
(87) 国際公開番号 W02015/167011	(72) 発明者 橋本 修一 東京都渋谷区本町三丁目12番1号 株式会社カイオム・ バイオサイエンス内
(87) 国際公開日 平成27年11月5日(2015.11.5)	(72) 発明者 内木 智朗 東京都渋谷区本町三丁目12番1号 株式会社カイオム・ バイオサイエンス内
審査請求日 平成30年4月27日(2018.4.27)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-95236 (P2014-95236)	
(32) 優先日 平成26年5月2日(2014.5.2)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	
前置審査	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト抗体を産生する細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

トリ抗体軽鎖遺伝子座において、ヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列で置換され、ならびに、トリ抗体重鎖遺伝子座において、ヒト抗体重鎖可変領域およびヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列が挿入され、ならびに、トリ抗体軽鎖偽遺伝子座において、ヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列25以上で置換され、およびトリ抗体重鎖偽遺伝子座において、ヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列30以上が挿入され、細胞膜表面にヒト抗体を発現し、および、培養液中にヒト抗体を分泌する能力を有する、トリB細胞。ただし、トリ抗体重鎖偽遺伝子座に挿入されるヒト抗体重鎖可変領域由来のDNAがコードするアミノ酸配列のうちCDR3領域を構成するアミノ酸の種類が9種類以下であるB細胞は除く。

【請求項2】

前記トリ抗体軽鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体軽鎖可変領域由来DNA配列の位置が、ヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列が存在する位置の上流であり、および、前記トリ抗体重鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体重鎖可変領域由来DNA配列の位置が、ヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列が存在する位置の上流であることを特徴とする請求項1に記載のトリB細胞。

【請求項3】

前記ヒト抗体重鎖が鎖であることを特徴とする請求項1または2に記載のトリB細胞。

## 【請求項 4】

前記ヒト抗体軽鎖が鎖または鎖であることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のトリB細胞。

## 【請求項 5】

トリB細胞がDT40細胞であることを特徴とする請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載のトリB細胞。

## 【請求項 6】

クロマチンを弛緩させる処理を行った請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のトリB細胞。

## 【請求項 7】

前記クロマチンを弛緩させる処理が、該トリB細胞中のヒストン脱アセチル化酵素の機能を低下または喪失させることである請求項 6 に記載のトリB細胞。

10

## 【請求項 8】

前記ヒストン脱アセチル化酵素の機能を低下または喪失させる方法が、該トリB細胞中のヒストン脱アセチル化酵素遺伝子の発現を低下または喪失させることである請求項 7 に記載のトリB細胞。

## 【請求項 9】

前記ヒストン脱アセチル化酵素がHDAC2であることを特徴とする請求項 8 に記載のトリB細胞。

## 【請求項 10】

前記ヒストン脱アセチル化酵素の機能を低下または喪失させる方法がHDAC阻害剤で処理することを特徴とする請求項 7 に記載のトリB細胞。

20

## 【請求項 11】

請求項 6 乃至 10 のいずれかに記載のトリB細胞からなる抗体産生細胞ライブラリー。

## 【請求項 12】

請求項 1 乃至 10 のいずれかに記載のトリB細胞からヒト抗体またはヒト型抗体を作製する方法であって、該B細胞を、ヒト抗体またはヒト型抗体を産生するためにトリB細胞に適した培養条件で培養し、該抗体を取得することを含む方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

30

本発明は、ヒト抗体を産生する細胞に関する。より具体的には、ヒト抗体を産生するトリB細胞に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

抗体は、生体物質の同定や機能解析などを行う上で有用であり、また、疾患の治療においても抗体の果たす役割は大きい。抗体は、生体内において特定の抗原と結合し、様々な生体内防御反応、例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性や、補体依存性細胞傷害（CDC）活性を惹起して、生体にとっての「異物」を認識し、除去を行う。このような抗体の能力に着目し、抗体医薬の開発が近年盛んに行われるようになってきた。多種多様な疾患の治療を行うには、様々な標的抗原を認識する抗体を迅速、簡便に供給する必要がある。

40

## 【0003】

これまで、所望の物理的、生理的特徴を備えた抗体群を調製する手法として、モノクローナル抗体の作製技術が用いられてきた。モノクローナル抗体を作製する場合、一般的には、生体内免疫によって生じたB細胞をミエローマと融合させるハイブリドーマ法が用いられる。しかしながら、この方法には、生体内免疫の利用によって生じる免疫寛容の他、最終的な所望の抗体を取得するまでに時間と労力が掛かるなど、多くの問題が存在している。

免疫寛容の問題を克服する技術として、生体内免疫を利用しない方法が開発された。この方法は、ファージ粒子に種々の抗体の可変領域からなる1本鎖抗体（single chain variable fragment: scFv）遺伝子を埋め込み、1本鎖抗体遺伝子産物をファージ上に提示させ

50

、このファージによる1本鎖抗体ライブラリーから目的抗原への親和性を有するクローンを取得する方法で、ファージディスプレイ法と呼ばれている。この技術は、免疫寛容を回避する点では優れているが、ファージライブラリーから得られるクローンは1本鎖であるため、組換えDNA技術等により、2本鎖から成る完全型の抗体の調製を行う必要がある。また、1本鎖抗体を完全型抗体にする過程で親和性に変化を生じることもあり、可変領域配列の調整が必要な場合も少なくない。従って、時間と労力の点においては、生体内免疫による方法と比較して、格段に進展したとまでは言い難い。

#### 【0004】

上記の既存のモノクローナル抗体作製技術の課題を克服した方法として、ADLibシステム（特許文献1および非特許文献1）およびADLibシステムをさらに改良した方法（特許文献2）が報告されている。ADLibシステムは、あらゆるタイプの抗原に対して、所望の結合特性を備えた多様な抗体を簡便に調製することが可能な技術である。この方法は、自律的に抗体遺伝子の多様化が進行したニワトリB細胞由来細胞株DT40によって構築される抗体ライブラリーから、所望の抗体を選択的に取得する技術である。ADLibシステムは、インビトロ系抗体作製技術の利点である免疫寛容の回避が可能である点、迅速にIgM型の完全抗体が得られる点において、従来の技術と比較して優れている。

#### 【0005】

一般的に、抗体を動物やヒトに医薬品として投与する場合には、体内での免疫原性を最小化することを考慮し、その動物種の型に合わせることが求められる。そこで、DNA組換え技術を利用して、マウスなどで作製したモノクローナル抗体の定常領域をヒト型に置換したキメラ抗体や、抗体の抗原認識部位（complementarity determining region：CDR）をヒト抗体に移植したヒト化抗体が作製された。しかし、キメラ化・ヒト化の過程において親和性や機能に変化を生じることもあり、機能を保持したヒト化抗体を作製できる確率は決して高いとはいえない。さらに、これらのキメラ抗体またはヒト化抗体は他の動物種に由来する領域が少ないため、元のモノクローナル抗体と比べて免疫原性は低いものの、抗原認識部位が免疫原性を持つため、抗抗体が現れるという問題点もあった。

そこで、マウスにヒト抗体遺伝子を遺伝子導入し、ヒト抗体を産生する動物の作製が試みられた。特許文献3では、ヒト抗体遺伝子を含む染色体断片のマイクロセルをマウスES細胞に移植し、該ES細胞からキメラマウスを作製することで、ヒト抗体を発現するキメラマウスを作製している。また、非特許文献2では、マウス抗体遺伝子座のゲノムDNAを対応するヒト抗体遺伝子座のゲノムDNAと置換することで、ヒト抗体を発現するキメラマウスを作製している。いずれの方法においても、完全にヒト抗体遺伝子に由来する抗原認識部位を持つ抗体の取得が可能であるが、やはり生体内免疫を利用することから、最終的な所望の抗体を取得するまでに要する時間と労力の問題は残っている。

#### 【0006】

以上のような状況において、ADLibシステムを使用する場合であっても、抗体医薬を調製するためには、ヒト由来のアミノ酸配列を持つ抗体をトリB細胞から産生させる方法が必要である。さらに、様々な疾患の治療を行うためには、多様な抗原認識特性を持つ抗体群を簡便に産生させる技術が必要となる。

しかしながら、マウスにヒト抗体遺伝子を導入して「ヒト化」する場合と異なり、トリB細胞を「ヒト化」する場合、抗体の多様化システムの相違が問題となる。なぜなら、トリ、ウサギ、ウシ、ヒツジなどの動物の場合、抗体可変領域の上流には、可変領域と類似した配列であってそれ自身は抗体遺伝子として発現していない偽遺伝子と呼ばれる配列が集まった領域があり、遺伝子変換と呼ばれる現象によって可変領域配列の全部または一部が偽遺伝子配列によって書き換えられることで、多様な配列が生み出されている。ヒトやマウスなどの動物においては、V(D)J組換えにより抗体の多様化が起こるのに対し、トリ、ウサギ、ウシ、ヒツジなどの動物においては、遺伝子変換という全く異なるメカニズムによって抗体の多様化が起きていることになる。さらに、偽遺伝子領域は非常に大量の繰り返し配列を含む構造になっていることもあり、当該領域の配列解析が非常に困難で、2015年3月時点においてもトリ抗体重鎖偽遺伝子領域は解読されていない。こういったメカ

10

20

30

40

50

ニズムの相違や抗体遺伝子座の構造上の問題から、トリB細胞から所望のヒト抗体を産生させるシステムを構築することは非常に困難であると考えられていた。

こういった背景の下、DT40細胞の抗体遺伝子座に存在する可変領域および偽遺伝子領域をヒト由来の配列に置換した細胞株を作製したことが報告された（非特許文献3）。本文献においては、トリ抗体可変領域を蛍光タンパク質であるGreen Fluorescent Protein（GFP）およびCyan Fluorescent Protein（CFP）ならびにリコンビナーゼ認識部位であるattP配列を含む遺伝子配列に置換した後、リコンビナーゼを利用してヒト抗体可変領域および後述する偽遺伝子配列を挿入したDT40細胞を作製し、遺伝子変換が起きることを確認している（非特許文献3、4）。しかし、定常領域はトリ由来配列をそのまま利用しているため、発現する抗体分子はヒト-トリのキメラ抗体であり、抗体の免疫原性は非常に高い。さらに、軽鎖はヒト由来の鎖とトリ由来の鎖との融合タンパク質になっていることから、その抗体分子は天然のヒト抗体とは大きく異なっている。よって、ヒトの治療用抗体とするにはさらなるキメラ化の操作が必要であり、キメラ化・ヒト化の過程において親和性や機能が変化する可能性が残っていることは変わらない。また、ここで用いた偽遺伝子領域の配列は、軽鎖については、挿入したヒト抗体可変領域のそれぞれのCDR配列を1アミノ酸ずつTyrまたはTrpへ置換した人工配列の集合体であるminimalist libraryや、天然に存在するヒト抗体可変領域のバリエーションに対してフレームワーク領域に変異を施したものを利用しており、重鎖については、挿入したヒト抗体可変領域のそれぞれのCDR配列を1アミノ酸ずつTyrまたはTrpへ置換した人工配列およびその変異配列で構成されている。これらは、少ない偽遺伝子で多様な抗原に対応することを目的として設計されたものであるが、該細胞における抗原特異的な抗体の取得については報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特許4214234号

【特許文献2】W02008/047480

【特許文献3】W097/07671

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Seoら、Nature Biotech, Volume 23, pp731-735, 2005

【非特許文献2】Recombinant Antibodies for Immunotherapy, pp100-108, 2009, Cambridge Press

【非特許文献3】Schusserら、PLOS ONE, Volume 8 issue 11 e80108, 2013

【非特許文献4】Leightonら、Frontiers in Immunology, Volume 6 Article 126, 2015

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

上記事情に鑑み、本発明の目的は、多様なヒト抗体を産生するトリB細胞を提供することである。

さらに、本発明の目的は、該トリB細胞から抗体を産生する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明者らは、多様なヒト抗体を産生する細胞の作製につき、鋭意研究を行った結果、トリB細胞の抗体軽鎖および重鎖遺伝子座において、ヒト抗体の軽鎖および重鎖の可変領域および定常領域の遺伝子を挿入または置換したところ、ヒト抗体を発現する形質転換細胞を得ることに成功した。また、発明者らは、さらに偽遺伝子として軽鎖・重鎖に複数個のヒト由来の抗体可変領域配列を挿入した形質転換細胞を作製し、この細胞をHDAC阻害剤処理したところ、本来のトリB細胞と同様に遺伝子変換が起きることを確認した。さらに、発明者らは、該細胞から抗原特異的なヒト抗体を産生させることに成功した。

すなわち、発明者らは、前記細胞を調製することで、該細胞から可変領域が種々に変更された抗体を取得できることを確認し、ヒト抗体であって、多様な抗体を産生させることに成功し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明の以下の(1)～(21)である。

(1) 抗体軽鎖遺伝子座において、ヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部が挿入され、またはヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部で置換され、ならびに、抗体重鎖遺伝子座において、ヒト抗体重鎖可変領域およびヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部が挿入され、またはヒト抗体重鎖可変領域およびヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部で置換され、ならびに、抗体軽鎖偽遺伝子座において、ヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列2以上が挿入され、またはヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列2以上で置換され、および/または、抗体重鎖偽遺伝子座において、ヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列2以上が挿入され、またはヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列2以上で置換されたトリB細胞。

10

(2) 抗体軽鎖偽遺伝子座において挿入され、または該抗体軽鎖偽遺伝子座の配列を置換する、ヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列の数が、5以上であることを特徴とする上記(1)に記載のトリB細胞。

(3) 抗体重鎖偽遺伝子座において挿入され、または該抗体重鎖偽遺伝子座の配列を置換する、ヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列の数が、5以上であることを特徴とする上記(1)に記載のトリB細胞。

20

(4) 抗体軽鎖偽遺伝子座において挿入、または該抗体軽鎖偽遺伝子座の配列を置換する、ヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列の数が、15以上であることを特徴とする上記(1)に記載のトリB細胞。

(5) 抗体重鎖偽遺伝子座において挿入され、または該抗体重鎖偽遺伝子座の配列を置換する、ヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列の数が、15以上であることを特徴とする上記(1)に記載のトリB細胞。

(6) 抗体軽鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体軽鎖可変領域由来DNA配列の位置が、ヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列が存在する位置の上流であり、および、抗体重鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体重鎖可変領域由来DNA配列の位置が、ヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列が存在する位置の上流であることを特徴とする上記(1)乃至(5)のいずれかに記載のトリB細胞。

30

(7) 抗体軽鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体軽鎖可変領域由来DNA配列および定常領域由来DNA配列の位置が、トリ抗体軽鎖可変領域および定常領域の位置よりも上流であり、および、抗体重鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体重鎖可変領域および定常領域の位置が、トリ抗体重鎖可変領域および定常領域の位置よりも上流であることを特徴とする上記(6)に記載のトリB細胞。

(8) 前記ヒト抗体重鎖が鎖であることを特徴とする上記(1)乃至(7)のいずれかに記載のトリB細胞。

(9) 前記ヒト抗体軽鎖が鎖または鎖であることを特徴とする上記(1)乃至(8)のいずれかに記載のトリB細胞。

40

(10) 前記トリB細胞が、細胞表面にヒト抗体を発現し、かつ培養液中にもヒト抗体を分泌する能力を有することを特徴とする上記(1)乃至(9)のいずれかに記載のトリB細胞。

(11) トリB細胞がDT40細胞であることを特徴とする上記(1)乃至(10)のいずれかに記載のトリB細胞。

(12) クロマチンを弛緩させる処理を行った上記(1)乃至(11)のいずれかに記載のトリB細胞。

(13) 前記クロマチンを弛緩させる処理が、該トリB細胞中のヒストン脱アセチル化酵素の機能を低下または喪失させることである上記(12)に記載のトリB細胞。

50

(14) 前記ヒストン脱アセチル化酵素の機能を低下または喪失させる方法が、該トリB細胞中のヒストン脱アセチル化酵素遺伝子の発現を低下または喪失させることである上記(13)に記載のトリB細胞。

(15) 前記ヒストン脱アセチル化酵素がHDAC2であることを特徴とする上記(14)に記載のトリB細胞。

(16) 前記ヒストン脱アセチル化酵素の機能を低下または喪失させる方法がHDAC阻害剤で処理することを特徴とする上記(13)に記載のトリB細胞。

(17) 上記(12)乃至(16)のいずれかに記載のトリB細胞からなる抗体産生細胞ライブラリー。

(18) 上記(1)乃至(16)のいずれかに記載のトリB細胞から抗体を作製する方法

10

。

(19) 上記(18)に記載の方法により取得される抗体。

(20) 上記(1)乃至(16)のいずれかに記載のトリB細胞を作製するためのキット

。

(21) 上記(18)に記載の方法により抗体を産生させるためのキット。

#### 【発明の効果】

#### 【0012】

本発明の細胞から、多様な抗原を認識するヒト抗体を簡便、かつ、迅速に取得することが可能となる。

#### 【図面の簡単な説明】

20

#### 【0013】

【図1】DT40細胞の抗体軽鎖定常領域および抗体軽鎖可変領域を、ヒト由来抗体(IgG)軽鎖定常領域および抗体軽鎖可変領域で置換するためのターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。cpV1～cpV3：トリ偽遺伝子

【図2】DT40細胞の抗体軽鎖偽遺伝子領域下流へ、遺伝子変換確認用配列(GC確認配列；ヒト抗体可変領域に由来する配列からなるヒト偽遺伝子。以下同じ。)を挿入するためのターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。cpV1～cpV3：トリ偽遺伝子

【図3】DT40細胞の抗体軽鎖偽遺伝子領域の欠損、およびDT40細胞の抗体軽鎖偽遺伝子領域をGC確認配列で置換するためのターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。cpV25、cpV1：トリ偽遺伝子

30

【図4】DT40細胞の抗体重鎖定常領域および抗体可変領域を、ヒト由来抗体(IgG)重鎖定常領域および抗体重鎖可変領域で置換し、さらに、GC確認配列を挿入するためのターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図5】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体軽鎖可変領域および抗体軽鎖定常領域で置換する手順と、得られたDT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を模式的に示した図である。cpV1～cpV3：トリ偽遺伝子

【図6】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体軽鎖可変領域および抗体軽鎖定常領域遺伝子で置換し、さらに、DT40細胞の抗体軽鎖偽遺伝子領域の下流にGC確認配列を挿入するための手順と、得られたDT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を模式的に示した図である。cpV1～cpV3：トリ偽遺伝子、hpV1～hpV2：ヒト偽遺伝子

40

【図7】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体軽鎖可変領域および抗体軽鎖定常領域遺伝子で置換し、さらに、DT40細胞の抗体軽鎖偽遺伝子領域を欠損させるための手順と、得られたDT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を模式的に示した図である。cpV25、cpV1：トリ偽遺伝子

【図8】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体軽鎖可変領域および抗体軽鎖定常領域遺伝子で置換し、さらにDT40細胞の偽遺伝子領域をGC確認配列に置換するための手順と、得られたDT40細胞抗体軽鎖遺伝子領域を模式的に示した図である。cpV25、cpV1：トリ偽遺伝子、hpV1、hpV2：ヒト偽遺伝子

【図9】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域に、ヒト由来抗体軽鎖遺伝子領域を挿入した細胞株、または、DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を、ヒト抗体軽鎖遺伝子で置換した細胞株が

50

産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図10】DT40細胞の抗体重鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体重鎖可変領域および抗体重鎖定常領域に変える手順と、得られたDT40細胞の抗体重鎖遺伝子領域を模式的に示した図である。

【図11】DT40細胞の抗体重鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体重鎖可変領域および抗体重鎖定常領域遺伝子に変え、さらに、DT40細胞の重鎖偽遺伝子領域の下流にGC確認配列を挿入するための手順と、得られたDT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域、および、使用したターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。hpV1、hpV2：ヒト偽遺伝子

【図12】DT40細胞の抗体重鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体重鎖可変領域および抗体重鎖定常領域遺伝子に変え、さらに、DT40細胞の重鎖偽遺伝子領域の下流にGC確認配列を挿入した細胞株が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図13】DT40細胞の抗体軽鎖の偽遺伝子領域を、ヒトIgの可変領域由来配列から成る偽遺伝子（ヒト軽鎖偽遺伝子）で置換する手順と、得られたDT40細胞の抗体軽鎖領域、および、使用したターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図14】DT40細胞の抗体重鎖定常領域を、ヒトIgG<sub>1</sub>の重鎖遺伝子領域に置換するためのターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図15】DT40細胞の抗体重鎖可変領域に、ヒト由来抗体重鎖可変領域と5個のヒトIgの可変領域由来配列から成る偽遺伝子（ヒト重鎖偽遺伝子）を導入するためのターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図16】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体軽鎖可変領域および抗体軽鎖定常領域で置換し、ヒト軽鎖偽遺伝子配列（5個）を挿入する手順と、得られたDT40細胞抗体軽鎖遺伝子領域を模式的に示した図である。cpV25、cpV1：トリ偽遺伝子

【図17】DT40細胞の抗体重鎖遺伝子領域に、ヒト由来抗体重鎖可変領域および抗体重鎖定常領域を導入し、ヒト重鎖偽遺伝子配列（5個）を挿入する手順と、得られたDT40細胞抗体重鎖遺伝子領域を模式的に示した図である。

【図18】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域および抗体重鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体遺伝子に変え、ヒト軽鎖偽遺伝子配列（5個）を挿入した細胞株が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図19】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体軽鎖可変領域および抗体軽鎖定常領域で置換し、ヒト重鎖偽遺伝子配列（15個）を挿入する手順と、用いたターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。pV25、pV1：トリ偽遺伝子

【図20】DT40細胞の抗体重鎖遺伝子領域に、ヒト由来抗体重鎖可変領域および抗体重鎖定常領域を導入し、ヒト重鎖偽遺伝子配列（15個）を挿入する手順と、用いたターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図21】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域および抗体重鎖遺伝子領域を、ヒト由来抗体遺伝子領域に変え、ヒト軽鎖偽遺伝子配列（15個）を挿入したL15/H15細胞株が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図22】図21に示した結果について、誤りのあったデータを優先日前のデータに基づいて修正したものを示す。

【図23】DT40細胞の抗体重鎖可変領域を、ヒト由来抗体重鎖可変領域で置換すると同時に、DT40細胞の抗体重鎖可変領域にRMCE用カセット配列を挿入する手順と、用いたターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図24】DT40細胞の抗体重鎖遺伝子領域に、ヒト重鎖偽遺伝子配列を30個挿入する手順と、用いたターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図25】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域および抗体重鎖遺伝子領域をヒト由来抗体遺伝子領域に変え、軽鎖にヒト軽鎖偽遺伝子配列を15個、重鎖にヒト重鎖偽遺伝子配列を30個挿入したL15/H30細胞株が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図26】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域に、ヒト軽鎖偽遺伝子配列を30個挿入する手順と、用いたターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

10

20

30

40

50

【図27】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域および抗体重鎖遺伝子領域をヒト由来抗体遺伝子領域に変え、軽鎖にヒト軽鎖偽遺伝子配列を30個、重鎖にヒト重鎖偽遺伝子配列を30個挿入したL30/H30細胞株が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図28】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域および抗体重鎖遺伝子領域をヒト由来抗体遺伝子領域に変え、軽鎖にヒト軽鎖偽遺伝子配列を30個、重鎖にヒト重鎖偽遺伝子配列を15個挿入したL30/H15細胞株が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図29】RMCE法を利用して、L30/H15細胞株の抗体重鎖遺伝子領域に、ヒト重鎖偽遺伝子配列を順向きまたは逆向きに15個追加挿入して合計30個にする手順と、用いたターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。図中、forおよびrevは、各々、順向き、逆向きを意味する。以下、他の図において同様。

【図30】RMCE法を利用してL30/H15細胞株の抗体重鎖遺伝子領域に、順向きまたは逆向きにヒト重鎖偽遺伝子配列15個を追加挿入した細胞株（順向きはL30/H15f15f細胞株、逆向きはL30/H15r15f細胞株）が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図31】L30/H15f15f細胞株およびL30/H15r15f細胞株の抗体重鎖遺伝子領域に、各々、ヒト重鎖偽遺伝子配列を順向きまたは逆向きに15個追加挿入して合計45個にする手順と、用いたターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図32】L30/H15f15f細胞株の抗体重鎖遺伝子領域に、順向きにヒト重鎖偽遺伝子配列15個を追加挿入した細胞株（L30/H15f15f15f細胞株）が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図33】L30/H15r15f細胞株の抗体重鎖遺伝子領域に、逆向きにヒト重鎖偽遺伝子配列15個を追加挿入した細胞株（L30/H15r15r15f細胞株）が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図34】RMCE法を利用して、L30/H15f15f15f細胞株およびL30/H15r15r15f細胞株の抗体重鎖遺伝子領域に、各々、ヒト重鎖偽遺伝子配列を順向きにまたは逆向きに15個追加挿入して合計60個にする手順と、用いたターゲティングベクターの構造を模式的に示した図である。

【図35】DT40細胞の抗体軽鎖遺伝子領域にヒト軽鎖偽遺伝子配列30個を挿入し、抗体重鎖遺伝子領域にヒト重鎖偽遺伝子60個を挿入した細胞株が産生する抗体について、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図36】TSA処理したL15/H15細胞株から、ADLibシステムを用いてPlexin A4タンパク質に結合する細胞集団を分離し、フローサイトメトリーにより解析した結果を示す。

【図37】図36のP5エリアの細胞集団に対してsingle cell sortingを行った後、96well plateに播種して培養し、各ウェルの細胞上清に対し、ELISA解析を行った結果を示す。横軸は、測定試料である細胞上清が由来する96well plateの各ウェル画分の番号を示す。Trypsin inhibitor: トリプシンインヒビター、SA: ストレプトアビジン、OA: オボアルブミン

【図38】ウェスタンブロット法により、陽性クローンである#62および#20から分泌されている抗体の分析を行った。還元および非還元の条件でサンプルを処理し、ヤギ抗ヒトIgG抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った結果を示す。

【図39】ウェスタンブロット法により、陽性クローンである#62および#20から分泌されている抗体の分析を行った。還元および非還元の条件でサンプルを処理し、ヤギ抗ヒトIgG抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った結果を示す。

【図40】ウェスタンブロット法により、陽性クローンである#62および#20から分泌されている抗体の分析を行った。還元および非還元の条件でサンプルを処理し、ヤギ抗トリIgM抗体を用いてウェスタンブロットティングを行った結果を示す。

【図41】TSA処理したL15/H15細胞株から、ADLibシステムを用いてHis-AP-hSema3Aに結合する細胞集団の1次スクリーニングの結果を示す。

10

20

30

40

50

【図4 2】His-AP-hSema3Aに結合する細胞集団をモノクローン化した後に行った2次スクリーニングの結果を示す。

【図4 3】ウェスタンブロット法により、2次スクリーニング後の陽性クローンから分泌されるHis-AP-hSema3A抗体の分析を行った。還元および非還元の条件でサンプルを処理し、ヤギ抗ヒトIgG 抗体またはヤギ抗ヒトIgG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。

【図4 4】TSA処理したL30/H45細胞株から、ADLibシステムを用いてIL-8に結合する細胞集団の1次スクリーニングの結果を示す。

【図4 5】IL-8に結合する細胞集団をモノクローン化した後に行った2次スクリーニングの結果を示す。

【図4 6】ウェスタンブロット法により、2次スクリーニング後の陽性クローンから分泌されるIL-8抗体の分析を行った。還元および非還元の条件でサンプルを処理し、ヤギ抗ヒトIgG 抗体またはヤギ抗ヒトIgG 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明の実施形態の1つは、抗体軽鎖遺伝子座において、ヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部が挿入され、またはヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部で置換され、ならびに、抗体重鎖遺伝子座において、ヒト抗体重鎖可変領域およびヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部が挿入され、またはヒト抗体重鎖可変領域およびヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部で置換され、ならびに、抗体軽鎖偽遺伝子座において、ヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列2以上が挿入され、またはヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列2以上で置換され、および/または、抗体重鎖偽遺伝子座において、ヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列2以上が挿入され、またはヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列2以上で置換されたトリB細胞である。

本発明のB細胞は、トリ由来の抗体産生B細胞であり、例えば、ニワトリ由来のDT40細胞を挙げることができる。その他にも、遺伝子変換によって抗体配列を多様化するシステムを有するウシ、ヒツジ、ウサギなどのB細胞も用いることができる。

また、本発明のトリB細胞は、その抗体軽鎖遺伝子座において、ヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部が挿入され、またはヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部で置換され、ならびに、その抗体重鎖遺伝子座において、ヒト抗体重鎖可変領域およびヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部が挿入され、またはヒト抗体重鎖可変領域およびヒト抗体重鎖定常領域由来DNA配列の全部または一部で置換され、ならびに、抗体軽鎖偽遺伝子座において、ヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列2以上が挿入、またはヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列2以上で置換され、および/または、抗体重鎖偽遺伝子座において、ヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列2以上が挿入され、またはヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列2以上で置換されている他、他の遺伝子領域等に変異や修飾が施されていてもよい。

【0015】

ここで、抗体軽鎖遺伝子座とは、抗体の軽鎖可変領域および軽鎖定常領域をコードする遺伝子が存在する遺伝子座のことであり、抗体重鎖遺伝子座とは、抗体の重鎖可変領域および重鎖定常領域をコードする遺伝子が存在する遺伝子座のことである。

また、偽遺伝子とは、機能している遺伝子と類似の配列ではあるが、発現する遺伝子としては機能していないDNA配列のことをいう。トリの抗体軽鎖偽遺伝子座および重鎖偽遺伝子座は、各々、機能遺伝子が存在する抗体軽鎖遺伝子座および重鎖遺伝子座よりも上流に位置しており、遺伝子変換により多様性を生み出している。ヒトのゲノム中の抗体遺伝子座には偽遺伝子は存在しないが、本明細書においては、挿入されたヒト抗体可変領域と遺伝子変換を生じさせる目的でトリ抗体遺伝子座に導入された、ヒト抗体可変領域と類似

10

20

30

40

50

の配列を持つDNA配列を「ヒト偽遺伝子」と総称する。

【0016】

トリ抗体軽鎖遺伝子座に挿入され、またはトリ抗体軽鎖遺伝子座の配列と置換されているヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来のDNA配列は、各々、ヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域の全ての配列であっても、あるいは、その一部の配列であってもよい。また、トリ抗体軽鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列の位置は、ヒト抗体軽鎖定常領域由来のDNA配列が挿入されている位置の上流であることが望ましい。

同様に、トリ抗体重鎖遺伝子座に挿入され、またはトリ抗体重鎖遺伝子座の配列と置換されているヒト抗体重鎖可変領域およびヒト抗体定常領域由来のDNA配列は、各々、ヒト重鎖可変領域および重鎖定常領域の全ての配列であっても、あるいは、その一部の配列であってもよい。また、トリ抗体重鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列の位置は、ヒト抗体重鎖定常領域由来のDNA配列が挿入されている位置の上流であることが望ましい。

また、トリ抗体軽鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体軽鎖可変領域およびヒト抗体軽鎖定常領域由来のDNA配列の位置は、トリ抗体軽鎖可変領域およびトリ抗体軽鎖定常領域の位置よりも上流であることが望ましい。同様に、トリ抗体重鎖遺伝子座に挿入されているヒト抗体重鎖可変領域および重鎖定常領域由来のDNA配列の位置は、トリ抗体重鎖可変領域および重鎖定常領域の位置よりも上流であることが望ましい。

【0017】

本実施形態において、トリ抗体軽鎖偽遺伝子座に挿入され、またはトリ抗体軽鎖偽遺伝子座のDNA配列と置換されているヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列（本明細書および図面においては、「ヒト軽鎖偽遺伝子配列」とも記載する）は、公知のヒト抗体軽鎖可変領域の配列を用いることができる。こういった配列情報は、たとえばV Base (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>)のようなウェブサイトからも入手することができる。このヒト軽鎖偽遺伝子配列は、ヒト抗体軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、CDR3の全部またはその一部を含むDNA配列を使用することができるが、各CDRが、トリ抗体軽鎖遺伝子座に挿入され、またはトリ抗体軽鎖遺伝子座の配列と置換されているヒト抗体軽鎖可変領域のDNA配列や他のヒト軽鎖偽遺伝子配列のCDRと同一でないことが望ましい。また、ヒト軽鎖偽遺伝子配列のフレームワーク（FW）領域については、トリ抗体軽鎖遺伝子座に挿入され、またはトリ抗体軽鎖遺伝子の配列と置換されたヒト抗体軽鎖可変領域のそれと一致していることが望ましい。たとえば、抗体軽鎖可変領域として配列番号5のDNA配列を選択した場合、軽鎖偽遺伝子は配列番号69～配列番号88および配列番号127～配列番号141に示す配列などを組み合わせて使用することができる。

同様に、トリ抗体重鎖偽遺伝子座に挿入され、またはトリ抗体重鎖偽遺伝子座の配列と置換されているヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列（本明細書および図面においては、「ヒト重鎖偽遺伝子配列」とも記載する）は、公知のヒト抗体重鎖可変領域の配列を用いることができる。こういった配列情報は、たとえばV Base (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/list2.php>)のようなウェブサイトからも入手することができる。このヒト重鎖偽遺伝子配列は、ヒト抗体重鎖可変領域のCDR1、CDR2、CDR3の全部またはその一部を含むDNA配列を使用することができるが、各CDRが、トリ抗体重鎖遺伝子座に挿入され、またはトリ抗体重鎖遺伝子座の配列と置換されているヒト抗体重鎖可変領域のDNA配列や他のヒト重鎖偽遺伝子配列のCDRと同一でないことが望ましい。また、ヒト重鎖偽遺伝子配列のフレームワーク（FW）領域については、トリ重鎖抗体遺伝子座に挿入され、またはトリ重鎖抗体遺伝子座の配列と置換されたヒト抗体重鎖可変領域のそれと一致していることが望ましい。たとえば、抗体重鎖可変領域として配列番号30のDNA配列を選択した場合、重鎖偽遺伝子は配列番号89～配列番号108、配列番号127～配列番号141、配列番号147～配列番号161および配列番号165～配列番号179に示す配列などを組み合わせて使用することができる。

【0018】

本実施形態において、トリ抗体軽鎖偽遺伝子座に挿入されているヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列の位置は、トリ抗体軽鎖偽遺伝子座に挿入されているヒト抗体軽鎖可変領域より上流に位置することが望ましく、また、トリ抗体軽鎖偽遺伝子配列が残っている場合においては、トリ抗体軽鎖偽遺伝子領域より下流に位置していることが望ましい。同様に、トリ抗体重鎖偽遺伝子座に挿入されているヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列の位置は、トリ抗体重鎖偽遺伝子座に挿入されているヒト抗体重鎖可変領域より上流に位置することが望ましく、また、トリ抗体重鎖偽遺伝子配列が残っている場合においては、トリ抗体重鎖偽遺伝子領域より下流に位置していることが望ましい。

また、本実施形態において、トリ抗体可変領域の上流に偽遺伝子として挿入または置換されるヒト抗体可変領域由来のDNA配列は、トリ抗体可変領域に挿入または置換されたヒト抗体可変領域配列と同じ向きでも逆向きでも、どちらでも利用可能である。

#### 【0019】

トリ抗体軽鎖偽遺伝子座に挿入され、または、トリ抗体軽鎖偽遺伝子座の偽遺伝子を置換する（置き換える）ヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列の数は、好ましくは、2以上、より好ましくは5以上、7以上、9以上、11以上、13以上、さらに好ましくは15以上、20以上、25以上である。同様に、トリ抗体重鎖偽遺伝子座に挿入され、または、トリ抗体重鎖偽遺伝子座の偽遺伝子を置換する（置き換える）ヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列の数は、好ましくは、2以上、より好ましくは5以上、7以上、9以上、11以上、13以上、さらに好ましくは15以上、20以上、25以上、もっとも好ましくは30以上である。

なお、ここでいうヒト抗体軽鎖可変領域由来のDNA配列またはヒト抗体重鎖可変領域由来のDNA配列は、FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4のいずれか1個を含み、可変領域にわたる領域に含まれる連続した一連の可変領域相同配列を以って1個として取り扱う。

本実施形態において、トリ抗体重鎖遺伝子座に挿入されるヒト抗体重鎖の種類は、鎖、 $\mu$ 鎖、鎖、鎖、鎖のいずれであってもよいが、好ましくは、鎖である。また、トリ抗体軽鎖遺伝子座およびトリ抗体軽鎖偽遺伝子座に挿入されるヒト抗体軽鎖の種類は、鎖と鎖のいずれであってもよい。

本実施形態において、遺伝子導入を行ったトリB細胞を抗体ライブラリーとして利用するためには、該トリB細胞が細胞膜表面にヒト抗体を発現するのみでなく、培養液中にヒト抗体を分泌する能力を有することが好ましい。このためには、導入したヒト抗体遺伝子が転写される際に、生体における発現制御の機構に類似したalternative splicingが適切に起こる必要がある。そのため、定常領域の遺伝子導入においては、トリ抗体重鎖定常領域と完全に同じゲノム構造を利用することが理想的であるが、トリの当該ゲノム領域の塩基配列は2015年3月の時点で解読されていないため、これを用いることができない。本実施形態においてはマウス抗体重鎖ゲノム配列中のイントロン配列を利用し、その結果、細胞膜表面と分泌型の両方のヒト抗体を同時に発現させることに成功していることから、マウスやヒトなど、公知の哺乳類動物由来のイントロン配列で代用することも可能である。

#### 【0020】

本実施形態において、トリ抗体遺伝子座にヒト抗体遺伝子を挿入および/またはヒト抗体遺伝子で置換する方法としては、相同組換えを利用したノックイン法が用いられる。また、トリ抗体鎖遺伝子座の偽遺伝子領域にヒト抗体可変領域由来配列を挿入および/またはヒト抗体遺伝子で置換する方法としては、相同組換えを利用したノックイン法のほか、部位特異的組換えを利用したRecombinase mediated cassette exchange (RMCE)法が好ましく利用できる。

#### 【0021】

本実施形態で作製されるトリB細胞には、上述のように、ヒトの抗体遺伝子座由来のDNA配列を挿入またはヒトの抗体遺伝子座由来のDNA配列で置換した細胞の他、該細胞のヒト由来抗体軽鎖または重鎖可変領域に、さらに、多種多様な変異を導入したトリB細胞も含まれる。抗体の多様性は、可変領域が再編成されることで、多様な可変領域の配列が生じることによって達成される。よって、本実施形態で作製されるトリB細胞には、可変領域

10

20

30

40

50

の再編成に必要な多様な変異を導入する処理が施されたトリB細胞も含まれる。ここで、可変領域の再編成に必要な変異を導入する方法は、例えば、XRCC2およびXRCC3を欠失させたB細胞を使用する方法（例えば、Cumber et al., Nature Biotech. 204:1129-1134 2002 または特開2003-503750など）、AID遺伝子の発現を制御する方法（例えば、Kanayama et al., Nucleic Acids Res. 34:e10., 2006または特開2004-298072など）、あるいは、クロマチンを弛緩させて遺伝子変換を促進する方法（例えば、特許文献1、特許文献2または非特許文献1など）など、当該技術分野で公知の方法を利用することができる。とりわけ、好ましい方法は、クロマチンを弛緩させて遺伝子変換を促進させる方法である。

#### 【0022】

トリB細胞中のクロマチンを弛緩させる方法としては、例えば、トリB細胞中に内在するヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）活性を何らかの方法で阻害して、該細胞内における遺伝子変換を著しく促進させる方法をあげることができる（詳細は、上記特許文献1、特許文献2または非特許文献1などを参照のこと）。細胞に内在するHDACの活性を阻害する方法として、HDAC阻害剤で、本発明のB細胞を処理する方法（特許文献1または非特許文献1を参照）やトリB細胞中のHDAC遺伝子の機能を低下または喪失させる方法（特許文献2を参照）などを使用することができる。HDAC阻害剤は、HDACの活性を阻害するものであれば特に限定されるものではなく、例えば、トリコスタチンA（TSA）、ブチル酸、バルブ口酸、suberoylanilide hydroxamic acid（SAHA）、CBHA（m-carboxycinnamic acid bis-hydroxamide）、PTACH、Apicidin、Scriptaid、M344、APHA compound 8、BML-210、Oxamflatin、MS-275、などが使用可能である。その他、可能であれば、活性阻害の対象であるHDACの不活性型タンパク質（ドミナントネガティブ）などを阻害物質として使用してもよい。

HDAC遺伝子の機能を低下または喪失させる場合、遺伝子機能を低下または喪失させる対象となるHDACのアイソフォームは、使用する抗体産生B細胞によっても異なるが、好ましくは、HDAC2遺伝子である（詳細は、特許文献2を参照のこと）。

#### 【0023】

前記実施形態に関連した本発明の実施形態には、本発明のトリB細胞からなる抗体産生細胞ライブラリーが含まれる。当該細胞ライブラリーとは、本発明のトリB細胞であって、様々な抗原に対する抗体を産生する該トリB細胞の集団のことである。本発明の上記実施形態に記載したトリB細胞は、トリ抗体偽遺伝子座にヒト由来の抗体可変領域由来のDNA配列を挿入等することで産生される抗体可変領域配列に多様性が生じ、また、クロマチンの弛緩等の処理により、さらに抗体可変領域の配列が多様化し、様々な抗原に対する抗体を産生し得る能力を持つ細胞である。

従って、本発明のトリB細胞を複数含む集団は、多様な抗原に対する抗体を産生する細胞集団であるといえることができる。

#### 【0024】

本発明の他の実施形態は、本発明のトリB細胞から抗体を産生する方法、および、調製された抗体である。

本発明のトリB細胞から産生される抗体は、ヒト型抗体であり、より好ましくは、ヒト抗体である。ヒト型抗体とは、産生される抗体の重鎖または軽鎖のアミノ酸配列に、トリ遺伝子由来の配列が一部含まれた抗体のことであり、ヒト抗体とは、産生される抗体の重鎖または軽鎖のアミノ酸配列が全てヒト遺伝子由来の配列である抗体のことである。

本発明のトリB細胞を該細胞に適した培養条件で培養を行うと、ヒト型抗体またはヒト抗体を産生する。DT40細胞のようなトリB細胞由来の細胞株においては、それほど高い効率ではないが、抗体遺伝子座において遺伝子変換が生じていることが知られている。従って、本発明のトリB細胞においても、遺伝子変換が生じており、ヒト由来の抗体遺伝子を挿入された抗体遺伝子座の遺伝子変換によって、産生される抗体の第一次の多様性が獲得されている。さらに、その上で、本発明のトリB細胞のクロマチンを弛緩させることにより、抗体遺伝子座における遺伝子変換効率をさらに上昇させることで、より多様な抗体を産生し得るトリB細胞の集団を調製することが可能である。このようなクロマチンの弛緩

を利用して、所望の抗原特異性を示す抗体を産生するトリB細胞を選択するために、ADLibシステムを利用することができる。前述の抗体産生細胞ライブラリーは、ADLibシステムを利用することによっても調製が可能である（特許文献1または非特許文献1を参照のこと）。

また、特に、膜結合蛋白質に対する所望の抗体を取得する方法としては、ADLib axCELL (antigen expressing cell) 法を利用することができる（WO2010/064454）。

#### 【0025】

本発明の他の実施形態には、本発明のトリB細胞の作製または抗体を産生させるためのキットが含まれる。

トリB細胞を作製するためのキットとしては、トリB細胞を培養するために必要な培地や必要なサプリメントなどの他、トリB細胞の抗体遺伝子座等において、ヒト抗体遺伝子由来のDNA配列を挿入あるいは、ヒト抗体遺伝子由来のDNA配列で置換を行うためのベクターや、試薬類が含まれる。さらには、抗体産生細胞ライブラリーを調製するために必要な要素、例えば、HDAC阻害剤やHDAC遺伝子の機能低下または機能喪失を行うために必要な試薬類が含まれていてもよい。

さらに、抗体を産生するためのキットには、所望の抗原特異性を有する抗体を選択するための試薬類として、例えば、種々の抗原、磁気ビーズなどの他、磁気ビーズ調製用試薬、抗体選択に使用される標識抗体、ELISAなどの検査に必要なプレートなど、抗体の作製に必要と考えられるものであれば、いかなる物が含まれていてもよい。

以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により何ら限定されるものではない。

#### 【実施例】

#### 【0026】

##### 遺伝子変換の確認

##### 1. ベクターの調製

##### 1-1. トリ抗体軽鎖 (Ig ) の定常領域・可変領域の置換 (human LC KI vector)

トリIg の定常領域および可変領域を置換するために、図1に示すようなターゲティングベクターを作製した。それぞれのパーツの作製方法を以下に示す。

##### (1) ヒトIg の可変領域および定常領域

ヒトパーキットリンパ腫細胞株Ramosから調製したcDNAを鋳型として、センスプライマー (TCCACCATGGCCTGGGCTCTG) (配列番号1) とアンチセンスプライマー (GTTGAGAACCTATGAACATTCTGTAGGGCCAC) (配列番号2) とを用いたPCRにより、ヒト抗体軽鎖 (Ig ) の可変領域および定常領域を増幅し、pGEM-T-Easy (プロメガ社) にクローニングし、pGEM-hIgG1-LCを得た。このプラスミドpGEM-hIgG1-LCを鋳型として、センスプライマー (ATTGGCGCGCCTCTCCAGGTTCCCTGGTGCAGGCACAGTCTGCCCTGACTCAGC) (配列番号3) とアンチセンスプライマー (TTCCATATGAGCGACTCACCTAGGACGGTCAGCTTGGTCC) (配列番号4) とを用いたPCRにより、ヒトIg の可変領域 (配列番号5) を得た。

また、pGEM-hIgG1-LCを鋳型として、センスプライマー (ATTGGCGCGCCTCTGCCTCTCTTGCAGTCCAGCCCAAGGCTGCCCCCTC) (配列番号6) とアンチセンスプライマー (GGAATTCCATATGGAGTGGACTACTATGAACATTCTGTAGGG) (配列番号7) とを用いたPCRによりヒトIg の定常領域 (配列番号8) を得た。

#### 【0027】

##### (2) Left Arm

ニワトリB細胞株DT40のゲノムDNAを鋳型にして、センスプライマー (GAGATCTCCTCCTCCCATCC) (配列番号9) とアンチセンスプライマー (CAAAGGACACGACAGAGCAA) (配列番号10) とを用いたPCRによりトリIg の可変領域上流から定常領域下流までの領域を増幅した。電気泳動によりFunctional allele (機能性対立遺伝子) とNon-functional allele (非機能性対立遺伝子) に分離し、約8.0kbpのFunctional alleleを切り出し、pGEM-T-Easyにクローニングし、pGEM-clgM-LCgenomeを得た。pGEM-clgM-LCgenomeを鋳型にして、センスプライマー (TGTCTCGAGTGAAGGTCACCAAGGATGG) (配列番号11) とアンチセンスプラ

10

20

30

40

50

イマー (TTAAGCTTGGAGAGGAGAGAGGGGAGAA) (配列番号 1 2) とを用いたPCRにより、配列番号 1 3 に示すLeft Armを得た。

【 0 0 2 8 】

( 3 ) Center Arm

pGEM-clgM-LCgenomeの配列解析からトリIg の可変領域と定常領域の間に位置するイントロン領域の配列を決定し、配列番号 1 4 に示すCenter Arm (途中に、両端にloxP配列を有するプラスサイジン耐性遺伝子を挿入している) を合成した。

【 0 0 2 9 】

( 4 ) Right Arm

pGEM-clgM-LCgenomeを用いてトリIg の定常領域の下流領域の配列を決定し、配列番号 1 5 に示すRight Arm (途中に、両端にlox2272配列を有するネオマイシン耐性遺伝子を挿入している) を合成した。

【 0 0 3 0 】

( 5 ) ターゲティングベクターの構築

pBluescriptに前記のLeft Arm、ヒトIg 可変領域、Center Arm、ヒトIg 定常領域、Right Armを図 1 に示す構造になるよう組み込み、human LC KI vectorを得た。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号 1 6 に示す。

【 0 0 3 1 】

1 - 2 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) の偽遺伝子領域下流へのノックイン (KI-C-IN vector)

トリIg の偽遺伝子領域下流に、遺伝子変換を確認するための配列 (GC確認配列 ; ヒトIg の可変領域由来配列から成るヒト偽遺伝子。) (配列番号 1 7) を挿入するために、まず図 2 に示すようなターゲティングベクターを作製した。それぞれのパーツの作製方法を以下に示す。

( 1 ) Left Arm

DT40のゲノムDNAを鋳型にし、センスプライマー (TTCTGTGAGCTGAGAAAAGGAGTGTA) (配列番号 1 8) とアンチセンスプライマー (CCTGCATTGTGGCACAGCGGGGTT) (配列番号 1 9) を用いて、可変領域のプロモーターより上流の4.3kb (偽遺伝子 (pV) 1~3) をPCRで増幅した後、pCR4blunt-TOPO (ライフテクノロジーズ社) にクローニングし、pCR4-clgM-LC pV1genomeを得た。この配列に基づき、pV1-3を含む領域 (配列番号 2 0) をクローニングし、Left Armとした。

( 2 ) Right Arm

前項で得たpCR4-clgM-LCpV1genomeの配列に基づき、pV1とプロモーターの間の領域 (配列番号 2 1) にあたる部分をクローニングし、Right Armとした。

( 3 ) ターゲティングベクターの構築

pCR4blunt-TOPOに前記のLeft Arm、ネオマイシン耐性遺伝子、Right Armを図 2 に示す構造になるよう組み込み、KI-C-IN vectorを得た。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号 2 2 に示す。

【 0 0 3 2 】

1 - 3 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) の偽遺伝子領域下流へのGC確認配列の挿入 (KI-C-IN-C vector)

トリIg の偽遺伝子領域下流に、GC確認配列を挿入するために、図 2 に示すようなターゲティングベクターを作製した。それぞれのパーツの作製方法を以下に示す。

( 1 ) GC確認用配列

上記 1 - 1 でクローニングしたヒトIg の可変領域に基づき、それぞれのCDRに3塩基ずつ挿入した変異配列と3塩基ずつ欠損させた変異配列を設計し、それをトリIg 偽遺伝子領域の非翻訳領域配列を用いて連結したGC確認用配列 (配列番号 1 7) を合成した。

( 2 ) ターゲティングベクターの構築

上記 1 - 2 で作製したKI-C-IN vectorに、GC確認用配列を図 2 に示す構造になるよう組み込み、KI-C-IN-C vectorを得た。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号 2 3 に示す。

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

#### 1 - 4 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) の偽遺伝子領域の欠損 (KI-C-DE vector )

トリIg の偽遺伝子領域を欠損させるために、図 3 に示すようなターゲティングベクターを作製した。それぞれのパーツの作製方法を以下に示す。

##### ( 1 ) Left Arm

DT40のゲノムDNAを鋳型にし、センスプライマー (CGCTTTGTACGAACGTTGTCACGT) (配列番号 2 4 ) とアンチセンスプライマー (TACCTGAAGGTCTCTTTGTGTTTTG) (配列番号 2 5 ) を用いて、pV25より上流の約3.0kbをPCRで増幅した後、pCR4blunt-TOPOにクローニングし、配列番号 2 6 に示すLeft Armを得た。

##### ( 2 ) Right Arm

上記 1 - 2 で調製したRight Armと同じものを用いた。

10

##### ( 3 ) ターゲティングベクターの構築

pCR4blunt-TOPOに前記のLeft Arm、ネオマイシン耐性遺伝子、Right Armを図 3 に示す構造になるよう組み込み、KI-C-DE vectorを得た。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号 2 7 に示す。

【 0 0 3 4 】

#### 1 - 5 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) の偽遺伝子領域をGC確認用配列に置換 (KI-C-DE-C vector )

トリIg の偽遺伝子領域を、GC確認用配列に置換するために、図 3 に示すようなターゲティングベクターを作製した。それぞれのパーツの作製方法を以下に示す。

##### ( 1 ) GC確認用配列

上記 1 - 2 で調製したGC確認用配列を用いた。

20

##### ( 2 ) ターゲティングベクターの構築

上記 1 - 3 で作製したKI-C-DE vector に、前記のGC確認用配列を図 3 に示す構造になるよう組み込み、KI-C-DE-C vectorを得た。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号 2 8 に示す。

【 0 0 3 5 】

#### 1 - 6 . トリ抗体重鎖 (IgM) の定常領域・可変領域へのノックイン

トリIgM (IgM) の可変領域から定常領域  $\mu$  1 にかけての領域を、ヒト抗体重鎖 (IgG<sub>1</sub>) に置換するために、図 4 に示すようなターゲティングベクターを作製した。それぞれのパーツの作製方法を以下に示す。

30

##### ( 1 ) ヒトIgG<sub>1</sub> 定常領域

ヒトIgG<sub>1</sub> を含むヒトゲノム染色体14 32.33のショットガンシーケンシングで得られた配列のうち、IgG<sub>1</sub> に相当する配列を取得した (アクセッション番号: NW\_001838121.1) 。 4 1 5 2 0 番塩基と 4 3 1 1 7 番塩基の間の配列から “IGH1” の “C\_region” にあたるCH1, hinge, CH2, CH3, transmembrane domainの配列を抽出し、イントロンをマウスIgG<sub>2a</sub>由来の配列に置き換えた配列を設計し、合成によってヒトIgG<sub>1</sub> 定常領域配列 (配列番号 2 9 ) を得た。

##### ( 2 ) ヒトIgG<sub>1</sub> 可変領域

ヒトの生殖細胞由来のIgG<sub>1</sub> 可変領域遺伝子の配列に基づいて、VH3-23, D5-12, JH1配列を連結した配列を設計し、トリ由来の分泌シグナル配列やスプライシングシグナル配列を付加して、ヒトIgG<sub>1</sub> 可変領域 (配列番号 3 0 ) とした。

40

##### ( 3 ) Left Arm

DT40のゲノムDNAを鋳型にして、センスプライマー (TTCCCGAAGCGAAAGCCGCGT) (配列番号 3 1 ) とアンチセンスプライマー (ACTCACCGGAGGAGACGATGA) (配列番号 3 2 ) を用いて、トリIgM可変領域上流から可変領域にかけての領域をPCRで増幅し、約4.1kbpのフラグメントをクローニングし、pCR4 Blunt-TOPO-clgM-HC pV1genomeを得た。この配列に基づき、3' 側にVlox配列を付加したLeft Arm (配列番号 3 3 ) を設計・合成した。

【 0 0 3 6 】

##### ( 4 ) Center Arm 1

上記のLeft Armのクローニングの際にクローニングしたトリIgM可変領域上流から可変

50

領域にかけての約4.1kbpの配列に基づきトリIgM可変領域上流の約1.4kbpに相当するCenter Arm 1を合成した(配列番号34)。

(5) Center Arm 2

DT40のゲノム DNAを鋳型にして、センスプライマー (GGGGATCCTGGGTCAGTCGAAGGGGGCG) (配列番号35)とアンチセンスプライマー (GTGCGGCCGCCAAAAGCGGTAATCCACCC) (配列番号36)を用いて、トリIgM可変領域下流の約4.3kbpをPCRで増幅した後クローニングし、配列番号37に示すCenter Arm 2を得た。

(6) Right Arm

DT40のゲノム DNAを鋳型にして、センスプライマー (CCAAACCACCTCTGGTGTCC) (配列番号38)とアンチセンスプライマー (CAAACCAAACTACGGATTCTCTGACC) (配列番号39)を用いて、トリIgM定常領域 $\mu$ 2を含む約0.9kbpをPCRで増幅した後クローニングし、配列番号40に示すRight Armを得た。

(7) ターゲティングベクターの構築

pBluescriptに前記のLeft Arm、マルチクローニングサイト、Center Arm1、ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域、プラスタジジン耐性遺伝子、Center Arm 2、ヒトIgG<sub>1</sub>定常領域、ネオマイシン耐性遺伝子、Right Armを図4に示す構造になるよう組み込み、human HC V-C vectorを得た。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号41に示す。

【0037】

1 - 7 . トリ抗体重鎖 (IgM) の定常領域・可変領域・偽遺伝子領域へのノックイン (human HC KI vector)

トリIgMの偽遺伝子領域下流から定常領域 $\mu$ 1にかけての領域に、遺伝子変換を確認するための配列 (GC確認配列; ヒトIg の可変領域由来配列から成るヒト偽遺伝子。)、ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域およびヒトIgG<sub>1</sub>定常領域を挿入するために、図4に示すようなターゲティングベクターを作製した。それぞれのパーツの作製方法を以下に示す。

(1) ヒトIgG<sub>1</sub>定常領域

上記1 - 6に記載したヒトIgG<sub>1</sub>定常領域配列を用いた。

(2) ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域

上記1 - 6に記載したヒトIgG<sub>1</sub>可変領域を用いた。

(3) 遺伝子変換確認用配列

上記1 - 6で設計したヒトIg の可変領域に基づき、CDR1を1塩基欠損させ、CDR2を2塩基欠損させ、CDR3を1塩基挿入した変異配列を設計し、それをトリIg 偽遺伝子領域の非翻訳領域配列を用いて連結したGC確認用配列 (配列番号42)を合成した。

(4) Left Arm

上記1 - 6に記載したLeft Armを用いた。

【0038】

(5) Center Arm 1

上記1 - 6に記載したCenter Arm 1を用いた。

(6) Center Arm 2

上記1 - 6に記載したCenter Arm 2を用いた。

(7) Right Arm

上記1 - 6に記載したRight Armを用いた。

(8) ターゲティングベクターの構築

pBluescriptに前記のLeft Arm、GC確認用配列、Center Arm 1、ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域、プラスタジジン耐性遺伝子、Center Arm 2、ヒトIgG<sub>1</sub>定常領域、ネオマイシン耐性遺伝子、Right Armを図4に示す構造になるよう組み込み、human HC KI vectorを得た。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号43に示す。

【0039】

1 - 8 . Creリコンビナーゼを発現するベクターの構築

前記で作製したベクターの薬剤耐性遺伝子は両端にloxP配列を付加した形でベクターに組み込んでいるため、遺伝子導入後にCre リコンビナーゼを作用させることで当該遺伝子

10

20

30

40

50

を除去することができる。そこで、pEGFP-C1 (BD Bioscience社、#6084-1) に、配列番号 4 4 で示すCreリコンビナーゼ遺伝子を組み込み、配列番号 4 5 に示すCre\_EGFP-C1を作製した。

#### 【 0 0 4 0 】

##### 2 . 軽鎖をヒト配列に挿入・置換した細胞株の作製

宿主はニワトリのB細胞由来細胞株であるDT40を用いた。DT40の培養方法は以下の方法で行った。

CO<sub>2</sub>恒温槽を用いて、39.5 °C、5 % CO<sub>2</sub>存在下で培養した。培地はIMDM (ライフテクノロジー社) を用い、9 % FBS、1 % ニワトリ血清、ペニシリン100単位/mL、ストレプトマイシン100 µg/mL、モノチオグリセロール 50 µMを加えて使用した。以下、特に断りがない限り、「培地」とは前記組成のものを指す。

軽鎖での遺伝子変換を評価するために、下表に示す5種類の細胞株を用意した。

【表 1】

細胞株	軽鎖	偽遺伝子領域		可変領域	定常領域
		トリ由来配列	遺伝子組換え 検証用配列		
野生型		あり	なし	トリ型	トリ型
LP1		あり	なし	ヒト型	ヒト型
LP9		あり	あり	ヒト型	ヒト型
LP18		なし	なし	ヒト型	ヒト型
LP20		なし	あり	ヒト型	ヒト型

作製方法を以下に示す。

#### 【 0 0 4 1 】

##### 2 - 1 . 可変領域・定常領域をヒト型に置換した細胞株の作製

上記 1 - 1 で調製したhuman LC KI vectorを制限酵素NotIで直鎖状にした後、DT40細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入した。2 mg/mL のG418および10 µg/mLのブラストサイジンを加えた培地で7~10日間培養した。生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行い、目的の遺伝子座で遺伝子の置換が起こっていた細胞株を選択した。その細胞株に、上記 1 - 8 で作製したCre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、フローサイトメトリーによるsingle cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行い、薬剤耐性遺伝子が除去されていることが確認できた細胞株37-3を得た。その後、上記 1 - 2 で作製したKI-C-IN vectorを制限酵素NotIで直鎖状にした後、細胞株37-3に遺伝子導入した。2 mg/mL のG418を加えた培地で7~10日間培養した。生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行い、目的の遺伝子座に遺伝子の挿入が起こっていた細胞株LP1を得た (図 5)。

#### 【 0 0 4 2 】

##### 2 - 2 . 可変領域・定常領域をヒト型に置換し、さらにトリ偽遺伝子領域の下流に遺伝子変換確認用配列 (GC配列) を挿入した細胞株の作製

上記 1 - 3 で調製したKI-C-IN-C vectorを制限酵素NotIで直鎖状にした後、前段で得られた細胞株37-3に遺伝子導入した。2 mg/mL のG418を加えた培地で7~10日間培養した。生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行い、目的の遺伝子座に遺伝子の挿入が起こっていた細胞株LP9を得た (図 6)。

#### 【 0 0 4 3 】

##### 2 - 3 . 可変領域・定常領域をヒト型に置換し、さらにトリ偽遺伝子領域を欠損させた細胞株の作製

上記 1 - 4 で調製したKI-C-DE vectorを制限酵素NotIで直鎖状にした後、上記 2 - 1 で

得られた細胞株37-3に遺伝子導入した。2 mg/mL のG418を加えた培地で7~10日間培養した。生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行い、目的の遺伝子座に遺伝子の挿入が起こっていた細胞株LP18を得た(図7)。

#### 【0044】

2-4. 可変領域・定常領域をヒト型に置換し、さらにトリ偽遺伝子領域を遺伝子変換確認用配列(GC配列)に置換した細胞株の作製

上記1-5で調製したKI-C-DE-C vectorを制限酵素Not Iで直鎖状にした後、上記2-1で得られた細胞株37-3に遺伝子導入した。2 mg/mL のG418を加えた培地で7~10日間培養した。生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行い、目的の遺伝子座で遺伝子の置換が起こっていた細胞株LP20を得た(図8)。

#### 【0045】

3. 抗体発現の確認(フローサイトメトリー、ELISA)

3-1. フローサイトメトリーによる解析

上記2で作製した細胞株の細胞表面に発現している抗体の解析を行った。それぞれの細胞株を培養し、96ウェルプレート(Nunc社、249662)に $5 \times 10^5$ 個ずつ分注し、150  $\mu$ LのFACS バッファー(0.3% 牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS)で2度洗浄した後、Goat anti-Chicken IgM-FITC conjugate(Bethyl社、A30-102F-20)、Goat Anti-Human IgG(Gamma chain specific)R-PE conjugate(Southern biotech社、A2040-09)またはGoat Anti-human lambda PE conjugate(Southern biotech社、2070-09)をFACSバッファーでそれぞれ1000倍、500倍、500倍に希釈した1次抗体液50  $\mu$ Lを添加した。氷上暗所で30分インキュベートした後、150  $\mu$ LのFACS バッファーで2度洗浄し、FACS バッファーで1000倍希釈したPI溶液200  $\mu$ Lを添加し、懸濁した。この懸濁液をフローサイトメトリー解析に供し、トリIgMおよびヒトIg(重鎖)またはヒトIg(軽鎖)の発現を解析したところ、図9に示すように、野生型のDT40ではトリIgMのみが発現しているのに対し、形質転換株のLP1、LP9、LP18、LP20ではトリIgMおよびヒトIgが発現していることを確認した。いずれの細胞株においても、遺伝子導入を行っていないIgの発現は認められなかった。

#### 【0046】

3-2. ELISAによる解析

上記2で作製された細胞から培養上清中に分泌されているトリIgMおよびヒトIgG<sub>1</sub>の濃度の測定を行った。それぞれの細胞株を、ニワトリ血清を含まない培地で $4 \times 10^5$  cells/mLに懸濁した後、24-well プレートに2 mLずつ播種し、3日間培養した後、培養液を回収し、0.22  $\mu$ m filterで濾過した後、測定に用いた。

IgGの測定方法は以下の通りである。1.0  $\mu$ g/mLのGoat anti-Human IgG-Fc affinity purified(Bethyl社、A80-104A)20  $\mu$ Lをイムノ384ウェルプレートマキシソープ(Nunc社、464718)に分注し室温で1時間以上反応させ、プレートに固相化した。その後、洗浄液(0.05% Tween20を含むPBS)で5回洗浄し、ブロッキング液(1% BSAを含むPBS)50  $\mu$ Lを加え、室温で30分間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、測定試料または標準物質となるHuman IgG1 Lambda-UNLB(SouthernBiotech社、0151L-01)を20  $\mu$ L加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、Goat anti-Human IgG-Fc HRP conjugated(Bethyl社、A80-104P)を1% BSAおよび0.05% Tween20を含むPBSで1000倍に希釈したものを20  $\mu$ L加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、TMB+(Dako社、S159985)20  $\mu$ Lを加え、室温で3分発色反応させ、1 N硫酸20  $\mu$ Lを加えて反応を停止させた。Infinite M1000(TECAN社)を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

IgMの測定にはalphaLISAイムノアッセイ(Perkin Elmer社)のシステムを用いた。Goat anti-chicken IgM antibody(Bethyl社、A30-102A)をChromalink™ Biotin Labeling Reagent(SoluLink Inc., #B1001-105)を用いてビオチン標識し、ビオチン化抗体を調製した。次に、Goat anti-chicken IgM antibody(Bethyl社、A30-102A)をUnconjugated AlphaLISAアクセプタービーズ(Perkin Elmer社)と結合させ、抗体結合Alpha Screenビーズを調製した。このビオチン標識抗体および抗体結合Alpha Screenビーズを、アッセイバッファー(1% BSAを含むPBS)でそれぞれ4.5 nMおよび50  $\mu$ g/mLに希釈した後、等量を

10

20

30

40

50

混合し、トリIgM濃度測定溶液とした。96ウェルプレート（Nunc社）において、トリIgM濃度測定溶液 20  $\mu$ Lと測定試料または標準物質となるトリ血清（GIBCO社、16110） 5  $\mu$ Lを混合した後、12.5  $\mu$ LずつをAlpha Plate-384（Perkin Elmer社）に分注した。室温で60分反応させた後、アッセイバッファーで80  $\mu$ g/mLに調製したAlphaScreen streptavidinドナービーズ（Perkin Elmer社）を12.5  $\mu$ L加え、室温遮光にて30分間反応させた。その後、EnSpire（Perkin Elmer社）を用いて解析を行った。

測定結果を表2に示す。野生型のDT40と同様に、形質転換株のLP1、LP9、LP18、LP20でもトリIgMが分泌されていることを確認した。

【表2】

細胞株	IgG ( $\mu$ g/mL)	IgM ( $\mu$ g/mL)
野生型	<0.01	2.30
LP1	<0.01	0.09
LP9	<0.01	0.10
LP18	<0.01	0.09
LP20	<0.01	0.03

10

20

## 【0047】

## 4. 遺伝子変換の確認

上記3においてヒトIg（軽鎖）の発現を確認した細胞株を、2.5 ng/mLのTSAを含む培地で20日間培養した後、 $1 \times 10^6$ 個の細胞からゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型とし、識別配列を付与したセンスプライマー（CGTATCGCCTCCCTCGGCCATCAGNNNNNNNNNCAGGTTCCCTGGTGACAGGC）（配列番号46）とアンチセンスプライマー（CTATCGCCTTGCCAGCCGCTCAGGCTTGGTCCCTCCGCCGAA）（配列番号47）を用いたPCRにより軽鎖可変領域を増幅し、アガロースゲル抽出による精製を行った後、QIAGEN PCR Purification Kit（QIAGEN社）を用いて濃縮した。ロシュ・ダイアグノスティックス社の次世代シーケンス解析システムを用いてこのサンプルの配列解析を行い、挿入したヒト偽遺伝子配列と同一の遺伝子配列が可変領域に存在するかどうかで遺伝子変換の有無を評価した。その結果を表3に示す。ヒト偽遺伝子配列を含まないLP1、LP18においては遺伝子変換が起こらなかったのに対し、ヒト偽遺伝子配列を持つLP9、LP20においては遺伝子変換が起こっていることを確認した。

30

【表3】

細胞株	配列数	組換えのあった配列数	頻度
LP1	785	0	0.0%
LP9	344	18	5.2%
LP18	378	0	0.0%
LP20	634	31	4.9%

40

## 【0048】

## 5. 重鎖をヒト配列に挿入・置換した細胞株の作製

重鎖での遺伝子変換を評価するために、表4に示す3種類の細胞株を用意した。

50

【表 4】

細胞株	重鎖	偽遺伝子領域		可変領域	定常領域
		トリ由来配列	遺伝子組換え 検証用配列		
野生型		あり	なし	トリ型	トリ型
T18		あり	なし	ヒト型	ヒト型
T11, T12		あり	あり	ヒト型	ヒト型

10

作製方法を以下に示す。

## 【 0 0 4 9 】

## 5 - 1 . 重鎖の可変領域・定常領域をヒト型に変換した細胞株の作製

上記 1 - 6 で得られた human HC V-C vector を制限酵素 SalI で直鎖状にした後、上記 2 - 2 で得られた細胞株 37-3 に遺伝子導入した。2 mg/mL の G418 および 10 µg/mL のブラストサイジンを加えた培地で 7 ~ 10 日間培養した。生育した細胞について PCR によるジェノタイプングを行い、目的の遺伝子座で遺伝子の置換が起こっている細胞株 T18 を得た ( 図 1 0 )。

## 【 0 0 5 0 】

## 5 - 2 . 重鎖の可変領域・定常領域をヒト型に変換し、偽遺伝子領域下流に遺伝子変換確認用配列 ( GC 確認配列 ) を挿入した細胞株の作製

上記 1 - 7 で得られた human HC KI vector を制限酵素 SalI で直鎖状にした後、上記 2 - 2 で得られた細胞株 37-3 に遺伝子導入した。2 mg/mL の G418 および 10 µg/mL のブラストサイジンを加えた培地で 7 ~ 10 日間培養した。生育した細胞について PCR によるジェノタイプングを行い、目的の遺伝子座で遺伝子の置換が起こっている細胞株 T11、T12 を得た ( 図 1 1 )。

20

## 【 0 0 5 1 】

## 6 . 抗体発現の確認 ( フローサイトメトリー、ELISA )

## 6 - 1 . フローサイトメトリーによる解析

上記 3 - 1 に記載した方法に基づき、上記 5 で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図 1 2 に示す。野生型の DT40 ではトリ IgM のみが発現しているのに対し、形質転換株である T18、T11、T12 においてはトリ IgM の発現が消失し、代わりにヒト Ig および Ig が発現していることを確認した。

30

## 【 0 0 5 2 】

## 6 - 2 . ELISA による解析

上記 3 - 2 に記載した方法に基づき、上記 5 で作製した細胞から培養上清中に分泌される抗体の濃度の測定を行った。その結果を表 5 に示す。6 - 1 と同様、野生型の DT40 ではトリ IgM のみが分泌されているのに対し、ヒト IgG<sub>1</sub> を導入した T18、T11、T12 はヒト IgG<sub>1</sub> が分泌されていることを確認した。

【表 5】

細胞株	IgG (μg/mL)	IgM (μg/mL)
野生型	<0.01	2.30
T18	1.00	0.03
T11	0.40	<0.01
T12	0.69	<0.01

10

## 【 0 0 5 3 】

## 7. 遺伝子変換の確認

上記 6 で抗体発現を確認した細胞株を用いて、遺伝子変換の確認を行った。上記 4 に記載した方法に基づいて抽出したゲノムDNAを鋳型として、センスプライマー (CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCGTGACGCGCTCTCT) (配列番号 48) と識別タグを付与したアンチセンスプライマー (CGTATGCGCCTCCCTCGCGCC ATCAGNNNNNNNNNCGGTGACCAGGGTGCCCTG) (配列番号 49) とを用いたPCRにより重鎖可変領域を増幅した後、上記 4 に記載した方法に基づいて配列解析を行った。その結果を表 6 に示す。ヒト偽遺伝子を含まないT18においては全く遺伝子変換が起こらなかったのに対し、ヒト偽遺伝子配列を持つT11、T12においては遺伝子変換が起きていることを確認した。

20

【表 6】

細胞株	配列数	組換えのあった配列数	頻度
T18	1125	0	0.0%
T11	3038	415	13.4%
T12	4108	305	7.4%

30

## 【 0 0 5 4 】

### 軽鎖・重鎖に各5個のヒト可変領域由来配列から成る偽遺伝子領域を挿入したL5/H5細胞株の作製

## 8. ベクターの調製

## 8-1. トリ抗体 (Ig ) 偽遺伝子領域へのノックイン

トリIg の偽遺伝子領域を、ヒトIg の可変領域由来配列から成る偽遺伝子 (ヒト軽鎖偽遺伝子) に置換するために、図 13 に示すようなターゲティングベクターを作製した。作製方法を以下に示す。

## (1) ヒト抗体軽鎖偽遺伝子配列 (pVL5) の設計と作製

データベース上のヒトゲノムのV(D)J組換えを起こしていないイムノグロブリン 軽鎖可変領域の遺伝子配列に基づいてCDR1、CDR2、CDR 3の配列を各々5個選択し、1-1でクローニングしたIg 可変領域のフレームワーク配列を組み合わせることで5個の配列pVL001 (配列番号 69)、pVL002 (配列番号 70)、pVL003 (配列番号 71)、pVL004 (配列番号 72) およびpVL005 (配列番号 73) を設計し、これらを含むヒト軽鎖偽遺伝子配列pVL5 (配列番号 50) を設計し、遺伝子合成した。

40

## (2) ターゲティングベクターの作製

上記 1-4 で作製したKI-C-DE vectorを元に、GC確認用配列を前項のヒト抗体軽鎖偽遺伝子配列pVL5に置換することで、human LCpV KI vectorを作製した。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号 51 に示す。

50

## 【 0 0 5 5 】

## 8 - 2 . トリ抗体重鎖 (IgM) 定常領域の置換

トリIgMの重鎖定常領域をヒトIgG<sub>1</sub>に置換するために、図14に示すようなターゲティングベクターを作製した。作製方法を以下に示す。

( 1 ) ヒトIgG<sub>1</sub>定常領域

上記1 - 6で作製したヒトIgG<sub>1</sub>定常領域を用いた。

## ( 2 ) Left Arm

上記1 - 6で作製したCenter Arm 2を用いた。

## ( 3 ) Right Arm

上記1 - 6で作製したRight Armを用いた。

10

## ( 4 ) ターゲティングベクターの作製

pBluescriptに前記のLeft Arm、ヒトIgG<sub>1</sub>定常領域配列、ネオマイシン耐性遺伝子、Right Armを組み込み、human CH KI vectorを作製した。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号52に示す。

## 【 0 0 5 6 】

## 8 - 3 . トリIgM可変・偽遺伝子領域への挿入

( 1 ) ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域

上記1 - 6で調製したヒトIgG<sub>1</sub>可変領域を用いた。

## ( 2 ) ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列 (pVH5) の設計と作製

データベース上のヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の配列に基づいてCDR1、CDR2、CDR3の配列を各々5個選択し、上記1 - 6でクローニングした可変領域のフレームワーク配列を組み合わせることで5個の配列pVH001 (配列番号89)、pVH002 (配列番号90)、pVH003 (配列番号91)、pVH004 (配列番号92)およびpVH005 (配列番号93)を設計し、これらを含むヒト抗体重鎖偽遺伝子配列pVH5 (配列番号53)を設計し、遺伝子合成した。

20

## ( 3 ) Left Arm

上記1 - 6で調製したLeft Armを用いた。

## ( 4 ) Center Arm

上記1 - 6で調製したCenter Arm 1を用いた。

## ( 5 ) Right arm

上記1 - 6で調製したCenter Arm 2を用いた。確認されたRight Armの配列を配列番号54に示す。

30

## ( 6 ) ターゲティングベクターの調製

pBluescriptに前記のLeft Arm、ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列pVH5、Center Arm、ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域配列、プラスタジン耐性遺伝子、Right Armを組み込み、human pVH VH KI vectorを得た。当該ベクターの遺伝子配列を配列番号55に示す。

## 【 0 0 5 7 】

## 9 . トリ抗体軽鎖および重鎖の遺伝子座に各5個のヒト偽遺伝子を導入したL5/H5細胞株の作製

上記2 - 2で得られた細胞株37-3に、上記8 - 2で調製したhuman CH KI vector、上記8 - 3で調製したhuman pVH VH KI vector、上記8 - 1で調製したhuman LC pV KI vectorを遺伝子導入することで、L5/H5細胞株細胞株を作製した (図15)。

40

制限酵素SalIで直鎖状にしたhuman CH KI vectorを37-3に遺伝子導入し、2 mg/mL のG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

次に、制限酵素SacIで直鎖状にしたhuman pVH VH KI vectorを遺伝子導入し、10 μg/mL のプラスタジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-

50

C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

最後に、制限酵素NotIで直鎖状にしたhuman LC pV KI vectorを遺伝子導入し、2mg/mLのG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行ったところ、目的の遺伝子座で置換が起こっている細胞株B-B10およびJ-D3を得た（図16、図17）。

#### 【0058】

##### 10．抗体発現の確認（フローサイトメトリー、ELISA）

##### 10-1．フローサイトメトリーによる解析

上記3-1に記載した方法に基づき、上記9で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図18に示す。野生型のDT40ではトリIgMのみが発現しているのに対し、形質転換株であるB-B10およびJ-D3においてはトリIgMの発現が消失し、代わりにヒトIgおよびIg<sub>1</sub>が発現していることを確認した。

#### 【0059】

##### 10-2．ELISAによる解析

上記3-2に記載されている方法に基づき、上記9で作製された細胞から分泌されている抗体の測定を行った。その結果を表7に示す。10-1と同様、野生型のDT40ではトリIgMのみが分泌されているのに対し、形質転換株のB-B10およびJ-D3ではヒトIg<sub>1</sub>が分泌されていることを確認した。

#### 【表7】

細胞株	IgG (μg/mL)	IgM (μg/mL)
野生型	<0.01	2.55
B-B10	2.19	0.01
J-D3	3.45	<0.01

#### 【0060】

##### 11．遺伝子変換の確認

上記10で抗体発現を確認した細胞株を用いて、遺伝子変換の確認を行った。TSA存在下で42日間培養した細胞から、上記4に記載した方法に基づいて抽出したゲノムDNAを鋳型として、識別配列を付与したセンスプライマー（CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNNNCAGTTCCCTGGTGCAGGC）（配列番号46）とアンチセンスプライマー（CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGTCCGTGCGCTCTCT）（配列番号56）とを用いたPCRにより軽鎖可変領域を、センスプライマー（CTATGCGCCTTGCCAGCCGCTCAGTCCGTGCGCTCTCT）（配列番号56）と識別タグを付与したアンチセンスプライマー（CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNNNTGGGGGGGTTTCATATGAAG）（配列番号57）とを用いたPCRにより重鎖可変領域を増幅した後、上記4に記載した方法に基づいて配列解析を行った。B-B10での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析の結果をそれぞれ表8および表9に示す。軽鎖と重鎖のいずれの可変領域においても挿入したヒト偽遺伝子由来の配列を含むクローンが確認され、遺伝子変換によって多様な配列が生み出されていることが示された。また、J-D3においても同様に、遺伝子変換によって多様な配列が生み出されていることを確認した。

【表 8】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.183	VL	pVL003	VL
2	0.046	Not matched	VL	pVL003
3	0.046	VL	VL	pVL004

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL001-005: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VL, pVL のいずれとも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

10

【表 9】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	11.176	pVH004	VH	VH
2	0.131	pVH001	VH	VH
3	0.131	pVH004	Not matched	VH
4	0.065	pVH003	VH	VH

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH001-005: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH, pVH のいずれとも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

20

## 【0061】

トリ抗体の軽鎖・重鎖遺伝子座に各15個のヒト可変領域由来配列を挿入したL15/H15細胞株の作製

30

## 1 2 . ベクターの調製

## 1 2 - 1 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) 可変・定常領域へのノックイン

上記 1 - 1 に記載した方法に基づき、図 1 9 に示すターゲティング用ベクター Lambda-V L-CL KI vector 2.0 を作製した。

## ( 1 ) ヒト Ig の可変領域および定常領域

上記 1 - 1 で作製した可変領域および定常領域を用いた。

## ( 2 ) Left Arm

上記 1 - 1 で作製した Left Arm を用いた。

## ( 3 ) Center Arm

上記 1 - 1 で作製した Center Arm を用いた。

40

## ( 4 ) Right Arm

上記 1 - 1 で決定したトリ抗体軽鎖の定常領域の下流領域の配列に基づき、Right Arm を合成した。

## ( 5 ) ターゲティングベクターの構築

pBluescript に前記の Left Arm、ヒト Ig 可変領域、Center Arm、ヒト Ig 定常領域、Right Arm を図 1 9 に示す構造になるよう組み込み、Lambda-VL-CL KI vector 2.0 (配列番号 5 8) を得た。

## 【0062】

## 1 2 - 2 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) 偽遺伝子のノックアウト

## ( 1 ) ヒト Ig 可変領域

50

上記 1 - 1 に記載した可変領域配列を用いた。

( 2 ) Left Arm

上記 1 - 2 に記載したLeft Arm を用いた。

( 3 ) Center Arm

上記 1 - 1 に記載したLeft ArmをCenter Armとして用いた。

( 4 ) Right Arm

上記 1 - 1 に記載したCenter ArmをRight Armを用いた。

( 5 ) マルチクローニングサイト

ヒト抗体軽鎖偽遺伝子配列pVL15を挿入するために、配列番号 5 9 に示すマルチクローニングサイトを設計した。

10

( 6 ) ターゲティングベクターの構築

pUC19にLeft Arm、ネオマイシン耐性遺伝子、マルチクローニングサイト、Center Arm、ヒトIg 可変領域、プラストサイジン耐性遺伝子、Right Armを組み込み、図 1 9 に示すようなターゲティングベクターpVL KI\_pUC19\_step5\_BrRev ( 配列番号 6 0 ) を構築した。

【 0 0 6 3 】

1 2 - 3 . トリ抗体軽鎖 ( Ig ) 偽遺伝子・可変領域へのノックイン

( 1 ) ヒト抗体軽鎖偽遺伝子配列 ( pVL15 )

データベース上のヒトイムノグロブリン 可変領域の配列に基づいてCDR1、CDR2、CDR 3の配列を15個選択し、上記 1 - 1 でクローニングしたヒトIg 可変領域のフレームワーク配列を組み合わせることで15個の配列pVL101 ( 配列番号 7 4 )、pVL102 ( 配列番号 7 5 )、pVL103 ( 配列番号 7 6 )、pVL104 ( 配列番号 7 7 )、pVL105 ( 配列番号 7 8 )、pVL106 ( 配列番号 7 9 )、pVL107 ( 配列番号 8 0 )、pVL108 ( 配列番号 8 1 )、pVL109 ( 配列番号 8 2 )、pVL110 ( 配列番号 8 3 )、pVL111 ( 配列番号 8 4 )、pVL112 ( 配列番号 8 5 )、pVL113 ( 配列番号 8 6 )、pVL114 ( 配列番号 8 7 )、pVL115 ( 配列番号 8 8 ) を設計し、これらを含むヒト抗体軽鎖偽遺伝子配列pVL15 ( 配列番号 6 1 ) を設計し、遺伝子合成した。

20

( 2 ) ターゲティングベクターの構築

上記 1 2 - 2 で作製したpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRevのマルチクローニングサイトに前項のヒト偽遺伝子配列pVL15を組み込み、図 1 9 に示すようなターゲティングベクターpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_pVL#odd ( 配列番号 6 2 ) を構築した。

30

【 0 0 6 4 】

1 2 - 4 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 定常領域へのノックイン

上記 8 - 2 で作製したhuman CH KI vectorを用いた。

【 0 0 6 5 】

1 2 - 5 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 可変領域へのノックイン

( 1 ) ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域

上記 1 - 6 に記載した可変領域配列を用いた。

( 2 ) Left Arm

上記 1 - 6 に記載したCenter Armを用いた。

( 3 ) Right Arm

上記 1 - 6 に記載したRight Armを用いた。

40

( 4 ) ターゲティングベクターの構築

pUC19にLeft Arm、ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域、プラストサイジン耐性遺伝子、Right Armを組み込み、図 2 0 に示すようなターゲティングベクターH(X)0・hV(B)\_074-009/No4 ( 配列番号 6 3 ) を作製した。

【 0 0 6 6 】

1 2 - 6 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 偽遺伝子領域へのノックイン

( 1 ) ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列 ( pVH15 )

データベース上のヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の配列に基づいてCDR1、CDR2、CD R 3の配列を15個選択し、上記 1 - 6 でクローニングしたヒトIgG<sub>1</sub>可変領域のフレームワ

50

ーク配列を組み合わせることで15個の配列pVH101(配列番号94)、pVH102(配列番号95)、pVH103(配列番号96)、pVH104(配列番号97)、pVH105(配列番号98)、pVH106(配列番号99)、pVH107(配列番号100)、pVH108(配列番号101)、pVH109(配列番号102)、pVH110(配列番号103)、pVH111(配列番号104)、pVH112(配列番号105)、pVH113(配列番号106)、pVH114(配列番号107)、pVH115(配列番号108)を設計し、これらを連結したヒト抗体重鎖偽遺伝子配列pVH15(配列番号64)を設計し、遺伝子合成した。

(2) Left Arm

上記1-6に記載したLeft Armを用いた。

(3) Right Arm

上記1-6に記載したCenter Armを用いた。

(4) マルチクローニングサイト

ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列を挿入するために、配列番号65に示すマルチクローニングサイトを設計した。

(5) Creリコンビナーゼによる部位特異的組換え(RMCE法)

偽遺伝子配列領域が長くなると、相同組換えによる導入効率が低下することが知られている。そこで、Creリコンビナーゼを用いて簡便に偽遺伝子配列を挿入することができるよう、RMCE法を利用することとした。そこで、loxm3 rev配列とloxm7 rev RE配列を含むRMCE用カセット配列を設計した。

(6) ターゲティングベクターの構築

pUC19にLeft Arm、ネオマイシン耐性遺伝子、RMCE用カセット配列、マルチクローニングサイト、Right Arm、ヒトIgG<sub>1</sub>可変領域を組み込んだ後、マルチクローニングサイトにヒト抗体重鎖偽遺伝子領域pVH15を組み込むことで、図20に示すようなターゲティングベクター pVH KI\_pUC19\_step3\_pVH#odd\_15pVH\_RMCE(配列番号66)を作製した。

【0067】

13. 細胞株の作製

DT40細胞に、上記12-1で調製したLambda-VL-CL KI vector 2.0、上記12-2で調製したpVL KI\_pUC19\_step5\_BrRev、上記12-3で調製したpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_pVL#odd、上記12-4で調製したhuman CH KI vector、上記12-5で調製したH(X)0・hV(B)\_074-009/No4および上記12-6で調製したpVH KI\_pUC19\_step3\_pVH#odd\_15pVH\_RMCEを遺伝子導入することで、細胞株を作製した。

まず、制限酵素SalIで直鎖状にしたhuman CH KI vectorを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起こっていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

次に、制限酵素NotIで直鎖状にしたLambda-VL-CL KI vector 2.0をDT40に遺伝子導入し、10 µg/mL のブラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起こっていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

さらに、制限酵素NotIで直鎖状にしたpVL KI\_pUC19\_step5\_BrRevを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418と10 µg/mL のブラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起こっていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

次に、制限酵素NotIで直鎖状にしたpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_pVL#oddを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418と10 µg/mL のブラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起こっていることを

10

20

30

40

50

確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

最後に、制限酵素ScaIで直鎖状にしたH(X)0・hV(B)\_074-009/No4および制限酵素NotIで直鎖状にしたpVH KI\_pUC19\_step3\_pVH#odd\_15pVH\_RMCEを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418 および10 µg/mLのプラスタサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起こっていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されている細胞株A12-3、A12-4、A12-5、B7-3、B7-9およびB7-11を得た。

10

## 【 0 0 6 8 】

## 1 4 . 抗体発現の確認 (フローサイトメトリー、ELISA)

## 1 4 - 1 . フローサイトメトリーによる解析

上記3に記載した方法に基づき、上記13で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図21および図22に示す。野生型のDT40ではトリIgMのみが発現しているのに対し、形質転換株のA12-3、A12-4、A12-5、B7-3、B7-9およびB7-11においてはトリIgMの発現が消失し、代わりにヒトIgG およびIgM が発現していることを確認した(図21、22)。なお、図21は、A12-5のIgM のヒストグラムに誤りがあったため、優先日前に取得していた正しいデータに修正した図22を添付した。

20

## 【 0 0 6 9 】

## 1 4 - 2 . ELISAによる解析

上記3-2に記載されている方法に基づき、上記13で作製された細胞から分泌されている抗体の測定を行った。その結果を表10に示す。10-1と同様、野生型のDT40ではトリIgMのみが分泌されているのに対し、形質転換株のA12-3、A12-4、A12-5、B7-3、B7-9およびB7-11ではヒトIgG<sub>1</sub>が分泌されていることを確認した。

## 【表10】

細胞株	IgG (µg/mL)	IgM (µg/mL)
野生型	<0.01	2.54
A12-3	0.52	<0.01
A12-4	0.51	<0.01
A12-5	0.65	0.01
B7-3	0.62	0.01
B7-9	0.76	0.02
B7-11	0.77	0.02

30

40

## 【 0 0 7 0 】

## 1 5 . 遺伝子変換の確認

上記14で抗体発現を確認した細胞株を用いて、遺伝子変換の確認を行った。TSA存在下で21日間ないしは42日間培養した細胞から、上記4に記載した方法に基づいて抽出したゲノムDNAを鋳型として、識別配列を付与したセンスプライマー (CGTATCGCCTCCCTCGCGCA TCAGNNNNNNNNCAGTTCCCTGGTGCAGGC) (配列番号46) とアンチセンスプライマー (CTA TGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCTTGGTCCCTCCGCCGAA) (配列番号47) とを用いたPCRにより軽

50

鎖可変領域を、センスプライマー（CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCGTCAGCGCTCTCT）（配列番号56）と識別タグを付与したアンチセンスプライマー（CGTATGCGCTCCCTCGCGCCATCA GNNNNNNNNNTGGGGGGGGTTCATATGAAG）（配列番号57）とを用いたPCRにより重鎖可変領域を増幅した後、上記4に記載した方法に基づいて配列解析を行った。そのうち、TSA存在下で21日間培養したB7-11での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果をそれぞれ表11および表12に、TSA存在下で42日間培養したB7-11での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果（上位10個）をそれぞれ表13および表14に示す。軽鎖と重鎖のいずれの可変領域においてもヒト偽遺伝子由来の配列を含むようなクローンが確認され、遺伝子変換により多様な配列が生み出されていることが示された。また、他の細胞株でも同様に、遺伝子変換により多様な配列が生み出されていることを確認した。

10

【表11】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.327	VL	pVL103	VL
2	0.327	VL	pVL102	VL
3	0.196	VL	VL	pVL114
4	0.196	VL	pVL105	VL
5	0.131	VL	pVL104	VL
6	0.131	VL	VL	pVL112
7	0.131	pVL105	VL	VL
8	0.065	VL	Not matched	pVL106
9	0.065	VL	pVL109	VL
10	0.065	VL	VL	pVL110
11	0.065	VL	pVL107	VL

20

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL101-115: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VL, pVL のいずれとも完全一致しない配列（部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる）

30

【表 1 2】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.46	pVH105	VH	VH
2	0.345	pVH108	VH	VH
3	0.345	VH	pVH107	Not matched
4	0.345	pVH107	VH	VH
5	0.345	pVH111	pVH111	VH
6	0.46	pVH112	Not matched	VH
7	0.23	pVH109	VH	VH
8	0.23	VH	pVH112	VH
9	0.23	pVH105	Not matched	VH
10	0.115	pVH108	pVH108	VH
11	0.115	VH	VH	pVH113
12	0.115	VH	VH	pVH109
13	0.115	pVH107	VH	Not matched
14	0.115	pVH103	Not matched	VH
15	0.23	pVH111	Not matched	VH
16	0.23	pVH111	Not matched	Not matched
17	0.115	pVH111	VH	VH

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH101-115: 偽遺伝子領域に挿入した配列

not matched: VH, pVH のいずれとも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突

然変異によるものと考えられる)

10

20

30

【表 1 3】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.175	VL	pVL109	VL
2	0.175	pVL105	VL	VL
3	0.175	pVL105	pVL105	VL
4	0.116*	VL	pVL105	VL
5	0.116*	VL	pVL105	VL
6	0.116	Not matched	pVL105	VL
7	0.058	VL	pVL109	Not matched
8	0.058	VL	VL	pVL114
9	0.058	VL	pVL102	VL
10	0.058	VL	pVL108	VL

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VL とも pVL とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR 以外の部分の配列が異なっている。

【表 1 4】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	1.789	pVH108	VH	VH
2	1.022	pVH112	VH	VH
3	0.681	pVH109	VH	VH
4	0.596	VH	pVH112	VH
5	0.596	pVH111	Not matched	VH
6	0.511	pVH107	VH	VH
7	0.426	pVH111	pVH111	VH
8	0.341	pVH111	VH	VH
9	0.256	pVH108	pVH108	VH
10	0.256	VH	pVH107	Not matched

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH とも pVH とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

## 【 0 0 7 1 】

軽鎖に15個、重鎖に30個のヒト可変領域由来配列から成る偽遺伝子領域を挿入したL15/H30細胞株の作製

1 6 . ベクターの調製

1 6 - 1 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) 可変・定常領域へのノックイン  
上記 1 2 - 1 で作製したLambda-VL-CL KI vector 2.0を用いた。

1 6 - 2 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) 偽遺伝子のノックアウト

上記 1 2 - 2 で作製した pVL KI\_pUC19\_step5\_BrRev を用いた。

【 0 0 7 2 】

1 6 - 3 . トリ抗体軽鎖 ( Ig ) 偽遺伝子・可変領域へのノックイン

上記 1 2 - 3 で作製した pVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_pVL#odd を用いた。

【 0 0 7 3 】

1 6 - 4 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 定常領域へのノックイン

上記 8 - 2 で作製した human CH KI vector を用いた。

【 0 0 7 4 】

1 6 - 5 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 可変領域のノックイン

( 1 ) ヒト IgG<sub>1</sub> 可変領域

上記 1 - 6 に記載した可変領域配列を用いた。

( 2 ) Left Arm

上記 1 - 6 に記載した Left Arm を用いた。

( 3 ) Center Arm

上記 1 - 6 に記載した Center Arm を用いた。

( 4 ) Right Arm

上記 1 - 6 に記載した Right Arm を用いた。

( 5 ) RMCE 用カセット配列

上記 1 2 - 6 で設計した RMCE 用カセット配列を用いた。

( 6 ) ターゲティングベクターの構築

pUC19 に Left Arm、ネオマイシン耐性遺伝子、RMCE 用カセット配列、Center Arm、ヒト IgG<sub>1</sub> 可変領域、Right Arm を組み込み、図 2 3 に示すようなターゲティングベクター pVH KI\_pUC19\_step5\_BsrRev\_RMCE\_cassette ( 配列番号 1 0 9 ) を作製した。

【 0 0 7 5 】

1 6 - 6 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 偽遺伝子領域へのノックイン

( 1 ) ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列 ( pVH30 )

データベース上のヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の配列に基づいて CDR1、CDR2、CDR3 の配列を 30 個選択し、上記 1 - 6 でクローニングしたヒト IgG<sub>1</sub> 可変領域のフレームワーク配列を組み合わせることで 30 個の配列 pVH101 ( 配列番号 9 4 )、pVH102 ( 配列番号 9 5 )、pVH103 ( 配列番号 9 6 )、pVH104 ( 配列番号 9 7 )、pVH105 ( 配列番号 9 8 )、pVH106 ( 配列番号 9 9 )、pVH107 ( 配列番号 1 0 0 )、pVH108 ( 配列番号 1 0 1 )、pVH109 ( 配列番号 1 0 2 )、pVH110 ( 配列番号 1 0 3 )、pVH111 ( 配列番号 1 0 4 )、pVH112 ( 配列番号 1 0 5 )、pVH113 ( 配列番号 1 0 6 )、pVH114 ( 配列番号 1 0 7 )、pVH115 ( 配列番号 1 0 8 )、pVH116 ( 配列番号 1 1 0 )、pVH117 ( 配列番号 1 1 1 )、pVH118 ( 配列番号 1 1 2 )、pVH119 ( 配列番号 1 1 3 )、pVH120 ( 配列番号 1 1 4 )、pVH121 ( 配列番号 1 1 5 )、pVH122 ( 配列番号 1 1 6 )、pVH123 ( 配列番号 1 1 7 )、pVH124 ( 配列番号 1 1 8 )、pVH125 ( 配列番号 1 1 9 )、pVH126 ( 配列番号 1 2 0 )、pVH127 ( 配列番号 1 2 1 )、pVH128 ( 配列番号 1 2 2 )、pVH129 ( 配列番号 1 2 3 )、pVH130 ( 配列番号 1 2 4 ) を設計し、これらを連結したヒト抗体重鎖偽遺伝子配列 pVH30 ( 配列番号 1 2 5 ) を設計し、遺伝子合成した。

( 2 ) Left Arm

上記 1 - 6 に記載した Left Arm を用いた。

( 3 ) Right Arm

上記 1 - 6 に記載した Center Arm を用いた。

( 4 ) マルチクローニングサイト

ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列を挿入するために、配列番号 6 5 に示すマルチクローニングサイトを設計した。

( 5 ) ターゲティングベクターの構築

pUC19 に Left Arm、ネオマイシン耐性遺伝子、マルチクローニングサイト、Right Arm、ヒト IgG<sub>1</sub> 可変領域を組み込んだ後、マルチクローニングサイトにヒト抗体重鎖偽遺伝子領

10

20

30

40

50

域pVH30を組み込むことで、図24に示すようなターゲティングベクター pVH KI\_pUC19\_step3\_pVH#odd\_even (配列番号126) を作製した。

【0076】

#### 17. 細胞株の作製

DT40細胞に、上記12-1で調製したLambda-VL-CL KI vector 2.0、上記12-2で調製したpVL KI\_pUC19\_step5\_BrRev、上記12-3で調製したpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_pVL#odd、上記12-4で調製したhuman CH KI vector、上記16-5で調製したpVH KI\_pUC19\_step5\_BsrRev\_RMCE\_cassetteおよび上記16-6で調製したpVH KI\_pUC19\_step3\_pVH#odd\_evenを遺伝子導入することで、細胞株を作製した。

まず、制限酵素SalIで直鎖状にしたhuman CH KI vectorを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

次に、制限酵素NotIで直鎖状にしたLambda-VL-CL KI vector 2.0をDT40に遺伝子導入し、10 µg/mL のプラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

さらに、制限酵素NotIで直鎖状にしたpVL KI\_pUC19\_step5\_BrRevを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418および10 µg/mL のプラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

次に、制限酵素NotIで直鎖状にしたpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_pVL#oddを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418および10 µg/mL のプラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

さらに、制限酵素NotIで直鎖状にしたpVH KI\_pUC19\_step5\_BsrRev\_RMCE\_cassetteを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418および10 µg/mL のプラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されていることを確認した。

最後に、制限酵素NotIで直鎖状にしたpVH KI\_pUC19\_step3\_pVH#odd\_evenを遺伝子導入し、2 mg/mL のG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されている細胞株#7-7、#11-3および#11-6を得た。

【0077】

#### 18. 抗体発現の確認 (フローサイトメトリー、ELISA)

##### 18-1. フローサイトメトリーによる解析

上記3に記載した方法に基づき、上記17で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図25に示す。野生型のDT40ではトリIgMのみが発現しているのに対し、形質転換株の#7-7、#11-3および#11-6においてはトリIgMの発現が消失し、代わりにヒトIgおよびIg が発現していることを確認した (図25)。

【0078】

10

20

30

40

50

## 18-2. ELISAによる解析

上記17で作製された細胞から分泌されている抗体の測定を行った。ヒトIgGの測定は上記3-2に記載されている方法に基づいて行った。トリIgMの測定法は以下の通りである。

1.0 µg/mLのGoat anti-chicken IgM (Bethyl社、A30-102A) 20 µLをイムノ384ウェルプレートマキシソープ (Nunc社、464718) に分注し、室温で1時間以上反応させ、プレート上に固相化した。その後、洗浄液 (0.05 % Tween20を含むPBS) で5回洗浄し、ブロッキング液 (1 % BSAを含むPBS) 50 µLを加え、室温で30分間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、測定試料または標準物質となるトリ血清 (GIBCO社、16110) を20 µL加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、Goat anti-chicken IgM HRP conjugated (Bethyl社、A30-102P) を1 % BSAおよび0.05 % Tween20を含むPBSで5000倍に希釈したものを20 µL加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、TMB+ (Dako社、S159985) 20 µLを加え、室温で3分発色反応させ、1 N硫酸 20 µLを加えて反応を停止させた。Infinite M1000 (TECAN社) を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

その結果を表15に示す。13-1と同様、野生型のDT40ではトリIgMのみが分泌されているのに対し、形質転換株の#7-7、#11-3および#11-6ではヒトIgG<sub>1</sub>が分泌されていることを確認した。

【表15】

	ヒト IgG1 (µg/mL)	トリ IgM (µg/mL)
野生型	<0.01	2.33
#7-7	0.13	<0.01
#11-3	0.24	<0.01
#11-6	0.16	<0.01

## 【0079】

## 19. 遺伝子変換の確認

上記18で抗体発現を確認した細胞株を用いて、遺伝子変換の確認を行った。TSA存在下で42日間培養した細胞株から、上記4に記載した方法に基づいて抽出したゲノムDNAを鋳型として、識別配列を付与したセンスプライマー (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNNCAGTTCCCTGGTGCAGGC) (配列番号46) とアンチセンスプライマー (CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCGTCAGCGCTCTCT) (配列番号56) とを用いたPCRにより軽鎖可変領域を、センスプライマー (CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCGTCAGCGCTCTCT) (配列番号56) と識別タグを付与したアンチセンスプライマー (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNTGGGGGGGTTTCATATGAAG) (配列番号57) とを用いたPCRにより重鎖可変領域を増幅した後、上記4に記載した方法に基づいて配列解析を行った。そのうち、#11-6での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果 (上位10個) をそれぞれ表16および表17に示す。軽鎖と重鎖のいずれの可変領域においても追加挿入したヒト偽遺伝子由来の配列を含むクローンが確認され、L15/H15細胞株よりさらに多様な配列が生み出されていることが示された。また、他の細胞株でも同様に、遺伝子変換により多様な配列が生み出されていることを確認した。

【表 16】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.166	VL	pVL105	VL
2	0.166	pVL105	VL	VL
3	0.125	pVL113	pVL113	pVL113
4	0.125	VL	pVL109	VL
5	0.083	Not matched	pVL105	VL
6	0.083	VL	pVL104	pVL104
7	0.083	VL	pVL113	VL
8	0.083	pVL114	pVL114	pVL114
9	0.042	pVL109	pVL109	pVL109
10	0.042	pVL115	pVL115	pVL115

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VLともpVLとも完全一致しない配列（部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる）

10

20

【表 17】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	1.077	pVH123	VH	VH
2	0.824	VH	pVH129	VH
3	0.760	pVH104	Not matched	VH
4	0.507	pVH123	Not matched	VH
5	0.444	pVH117	Not matched	VH
6	0.380	pVH129	pVH129	VH
7	0.380	pVH126	pVH112	VH
8	0.380	VH	pVH111	Not matched
9	0.317	pVH102	VH	Not matched
10	0.253	pVH112	Not matched	VH

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH と pVH とともに完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

## 【0080】

軽鎖に30個、重鎖に30個のヒト可変領域由来配列から成る偽遺伝子領域を挿入したL30/H30細胞株の作製

20 . トリ抗体軽鎖 (Ig ) 偽遺伝子・可変領域へのノックイン

(1) ヒト抗体軽鎖偽遺伝子配列 (pVL30)

データベース上のヒトイムノグロブリン 可変領域の配列に基づいてCDR1、CDR2、CDR3の配列を30個選択し、上記1-1でクローニングしたヒトIg 可変領域のフレームワーク配列を組み合わせることで30個の配列pVL101 (配列番号74)、pVL102 (配列番号75)、pVL103 (配列番号76)、pVL104 (配列番号77)、pVL105 (配列番号78)、pVL106 (配列番号79)、pVL107 (配列番号80)、pVL108 (配列番号81)、pVL109 (配列番号82)、pVL110 (配列番号83)、pVL111 (配列番号84)、pVL112 (配列番号85)、pVL113 (配列番号86)、pVL114 (配列番号87)、pVL115 (配列番号88)、pVL116 (配列番号127)、pVL117 (配列番号128)、pVL118 (配列番号129)、pVL119 (配列番号130)、pVL120 (配列番号131)、pVL121 (配列番号132)、pVL122 (配列番号133)、pVL123 (配列番号134)、pVL124 (配列番号135)、pVL125 (配列番号136)、pVL126 (配列番号137)、pVL127 (配列番号138)、pVL128 (配列番号139)、pVL129 (配列番号140)、pVL130 (配列番号141)を設計し、これらを含むヒト抗体軽鎖偽遺伝子配列pVL30 (配列番号142)を設計し、遺伝子合成した。

(2) ターゲティングベクターの構築

上記16-2のpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRevのMulti-cloning siteに前項のヒト偽遺伝子配列pVL30を組み込み、図26に示すようなターゲティングベクターpVL KI\_pUC19\_step6\_

10

20

30

40

50

BrRev\_#odd+even (配列番号 1 4 3) を構築した。

【 0 0 8 1 】

2 1 . 細胞株の作製

上記 1 7 で作製した L15/H30 細胞株に、上記 2 0 で調製した pVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_#odd+even を遺伝子導入することで、細胞株を作製した。

制限酵素 NotI で直鎖状にした pVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_#odd+even を遺伝子導入し、2 mg/mL の G418 および 10  $\mu$ g/mL のブラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞について PCR によるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起こっていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1 を遺伝子導入し、cell sorting により GFP 陽性細胞を選別した後、PCR によるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されている細胞株 #7-7-48-5、#7-7-48-7 および #7-7-48-10 を得た。

10

【 0 0 8 2 】

2 2 . 抗体発現の確認 (フローサイトメトリー、ELISA)

2 2 - 1 . フローサイトメトリーによる解析

上記 3 に記載した方法に基づき、上記 2 1 で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図 2 7 に示す。野生型の DT40 ではトリ IgM のみが発現しているのに対し、形質転換株の #7-7-48-5、#7-7-48-7 および #7-7-48-10 においてはトリ IgM の発現が消失し、代わりにヒト IgG および IgM が発現していることを確認した (図 2 7)。

【 0 0 8 3 】

2 2 - 2 . ELISA による解析

上記 1 8 - 2 に記載されている方法に基づき、上記 2 1 で作製された細胞から分泌されている抗体の測定を行った。その結果を表 1 8 に示す。1 3 - 1 と同様、野生型の DT40 ではトリ IgM のみが分泌されているのに対し、形質転換株の #7-7-48-5、#7-7-48-7 および #7-7-48-10 ではヒト IgG<sub>1</sub> が分泌されていることを確認した。

20

【表 1 8】

	ヒト IgG1 ( $\mu$ g/mL)	トリ IgM ( $\mu$ g/mL)
野生型	<0.01	2.33
#7-7-48-5	0.26	<0.01
#7-7-48-7	0.16	<0.01
#7-7-48-10	0.13	<0.01

30

【 0 0 8 4 】

2 3 . 遺伝子変換の確認

上記 2 2 で抗体発現を確認した細胞株を用いて、遺伝子変換の確認を行った。TSA 存在下で 42 日間培養した細胞株から、上記 4 に記載した方法に基づいて抽出したゲノム DNA を鋳型として、識別配列を付与したセンスプライマー (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNNCAGGTTCCCTGGTGCAGGC) (配列番号 4 6) とアンチセンスプライマー (CTATGCGCCTTGC CAGCCCGCTCAGGCTTGGTCCCTCCGCCGAA) (配列番号 4 7) とを用いた PCR により軽鎖可変領域を、センスプライマー (CTATGCGCCTTGC CAGCCCGCTCAGTCCGTGCGGCTCTCT) (配列番号 5 6) と識別タグを付与したアンチセンスプライマー (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNNTGGGGGGGGTTCATATGAAG) (配列番号 5 7) とを用いた PCR により重鎖可変領域を増幅した後、上記 4 に記載した方法に基づいて配列解析を行った。そのうち、7-7-48-10 での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果 (上位 10 個) をそれぞれ表 1 9 および表 2 0 に示す。軽鎖と重鎖のいずれの可変領域においても追加挿入したヒト偽遺伝子由来の配列を含むクローンが確認され、偽遺伝子の個数を増やすことでさらに多様な配列が生み出されていることが示された。また、他の細胞株でも同様に、遺伝子変換により多様な配列が生み

40

50

出されていることを確認した。

【表 19】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.347*	VL	pVL118	VL
2	0.270	pVL119	VL	VL
3	0.154	VL	pVL123	pVL118
4	0.116	pVL130	pVL130	pVL130
5	0.116	VL	VL	pVL127
6	0.077	pVL116	pVL116	pVL116
7	0.077	pVL119	pVL119	VL
8	0.077	VL	pVL129	pVL129
9	0.077	VL	pVL105	VL
10	0.077*	VL	pVL118	VL

10

20

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VL とも pVL とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR 以外の部分の配列が異なっている。

30

【表 2 0】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	33.191*	pVH104	Not matched	VH
2	8.085	pVH129	Not matched	VH
3	6.241	pVH108	Not matched	VH
4	5.106	pVH111	Not matched	VH
5	3.688**	pVH126	Not matched	VH
6	1.418	pVH126	pVH126	VH
7	1.418	pVH101	Not matched	VH
8	1.277*	pVH104	Not matched	VH
9	1.277**	pVH126	Not matched	VH
10	0.993*	pVH104	Not matched	VH

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH とも pVH とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR2 の配列が異なっている。

\*\*: CDR2 の配列が異なっている。

#### 【 0 0 8 5 】

軽鎖に30個、重鎖に15個のヒト可変領域由来配列から成る偽遺伝子領域を挿入したL30/H15細胞株の作製

#### 2 4 . 細胞株の作製

上記 1 7 で作製したL15/H15細胞株A12-4に、上記 2 0 で調製したpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_pVL#odd+evenを遺伝子導入することで、細胞株を作製した。

制限酵素NotIで直鎖状にしたpVL KI\_pUC19\_step6\_BrRev\_pVL#odd+evenを遺伝子導入し、2 mg/mLのG418および10 μg/mL のブラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した。その後、Cre\_pEGFP-C1を遺伝子導入し、cell sortingによりGFP陽性細胞を選別した後、PCRによるジェノタイピングを行って薬剤耐性遺伝子が除去されている細胞株A77-3およびA77-2を得た。

#### 【 0 0 8 6 】

#### 2 5 . 抗体発現の確認 (フローサイトメトリー、ELISA)

##### 2 5 - 1 . フローサイトメトリーによる解析

上記 3 に記載した方法に基づき、上記 2 4 で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図 2 8 に示す。野生型のDT40ではトリIgMのみが発現しているのに対し、形質転換株のA77-3およびA77-2においてはトリIgMの発現が消失し、代わりにヒトIg およびIg が発現していることを確認した (図 2 8 )。

## 【 0 0 8 7 】

## 2 5 - 2 . ELISAによる解析

上記 3 - 2 に記載されている方法に基づき、上記 2 4 で作製された細胞から分泌されている抗体の測定を行った。その結果を表 2 1 に示す。1 3 - 1 と同様、野生型のDT40ではトリIgMのみが分泌されているのに対し、形質転換株のA77-3およびA77-2ではヒトIgG<sub>1</sub>が分泌されていることを確認した。

【表 2 1】

	ヒト IgG1 ( $\mu$ g/mL)	トリ IgM ( $\mu$ g/mL)
野生型	<0.01	2.33
A77-3	0.43	<0.01
A77-2	0.48	<0.01

10

## 【 0 0 8 8 】

RMCE法を利用して軽鎖に30個、重鎖に30個のヒト可変領域由来配列から成る偽遺伝子領域を挿入したL30/H15f15fおよびL30/H15r15f細胞株の作製

## 2 6 . ベクターの作製

2 6 - 1 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 偽遺伝子領域へ、順向きに構築した偽遺伝子15個をさらに挿入

20

## ( 1 ) ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列 ( pVH15a )

上記 1 6 で設計したpVH116、pVH117、pVH118、pVH119、pVH120、pVH121、pVH122、pVH123、pVH124、pVH125、pVH126、pVH127、pVH128、pVH129、pVH130を順向きで連結させたpVH15a ( 配列番号 1 4 4 ) を作製した。

## ( 2 ) ベクターの構築

pUC57-Ampベクターに、loxm3 rev配列、Neomycin耐性遺伝子、SV40 early polyA terminator、SV40 polyadenylation region、loxP for RE配列、pVH15a ( 順向き ) 、loxm7 rev LE配列を挿入し、図 2 9 に示すようなベクターRMCE\_pVH1stKI\_pVH15evenFor ( 配列番号 1 4 5 ) を作製した。

30

## 【 0 0 8 9 】

2 6 - 2 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 偽遺伝子領域へ、逆向きに構築した偽遺伝子15個をさらに挿入

pUC57-Ampベクターに、loxm3 rev配列、Neomycin耐性遺伝子、SV40 early polyA terminator、SV40 polyadenylation region、loxP for RE配列、pVH15a ( 逆向き ) 、loxm7 rev LE配列を挿入し、図 2 9 に示すようなベクターRMCE\_pVH1stKI\_pVH15evenRev ( 配列番号 1 4 6 ) を作製した。

## 【 0 0 9 0 】

## 2 7 . 細胞株の作製

L30/H15f15f細胞株は、上記 2 4 で作製したL30/H15細胞株に、上記 2 6 - 1 で調製したRMCE\_pVH1stKI\_pVH15evenForを導入して作製した。

40

RMCE\_pVH1stKI\_pVH15evenFor をCre\_pEGFP-C1とともに遺伝子導入して部位特異的組換えを誘導した後、2 mg/mL のG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した細胞株1-6-1および1-7-3を得た。

L30/H15r15f細胞株は、上記 2 4 で作製したL30/H15細胞株に、上記 2 6 - 2 で調製したRMCE\_pVH1stKI\_pVH15evenRevを導入して作製した。

RMCE\_pVH1stKI\_pVH15evenRev をCre\_pEGFP-C1とともに遺伝子導入して部位特異的組換えを誘導した後、2 mg/mL のG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した細胞株2-

50

1-1および7-3-2を得た。

【 0 0 9 1 】

2 8 . 抗体発現の確認 (フローサイトメトリー、ELISA)

2 8 - 1 . フローサイトメトリーによる解析

上記3に記載した方法に基づき、上記27で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図30に示す。野生型のDT40ではトリIgMのみが発現しているのに対し、形質転換株の1-6-1、1-7-3、2-1-1および7-3-2においてはトリIgMの発現が消失し、代わりにヒトIg およびIg が発現していることを確認した(図30)。

【 0 0 9 2 】

2 8 - 2 . ELISAによる解析

上記3-2に記載されている方法に基づき、上記27で作製された細胞から分泌されている抗体の測定を行った。その結果を表22に示す。13-1と同様、野生型のDT40ではトリIgMのみが分泌されているのに対し、形質転換株の1-6-1、1-7-3、2-1-1および7-3-2ではヒトIgG<sub>1</sub>が分泌されていることを確認した。

【表22】

	ヒト IgG1 (μg/mL)	トリ IgM (μg/mL)
野生型	<0.01	2.33
1-6-1	0.18	<0.01
1-7-3	0.07	<0.01
2-1-1	0.12	<0.01
7-3-2	0.18	<0.01

【 0 0 9 3 】

2 9 . 遺伝子変換の確認

上記28で抗体発現を確認した細胞株を用いて、遺伝子変換の確認を行った。TSA存在下で42日間培養した細胞株から、上記4に記載した方法に基づいて抽出したゲノムDNAを鋳型として、識別配列を付与したセンスプライマー (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNCAGGTTCCCTGGTGCAGGC) (配列番号46)とアンチセンスプライマー (CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCGTCAGCGCTCTCT) (配列番号47)とを用いたPCRにより軽鎖可変領域を、センスプライマー (CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCGTCAGCGCTCTCT) (配列番号56)と識別タグを付与したアンチセンスプライマー (CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNTGGGGGGGTTTCATATGAAG) (配列番号57)とを用いたPCRにより重鎖可変領域を増幅した後、上記4に記載した方法に基づいて配列解析を行った。そのうち、1-6-1での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果(上位10個)をそれぞれ表23および表24に、7-3-2での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果(上位10個)をそれぞれ表25および表26に示す。軽鎖と重鎖のいずれの可変領域においても追加挿入したヒト偽遺伝子由来の配列を含むクローンが確認され、L30/H30細胞株と同様に多様な配列が生み出されていることが示された。また、他の細胞株でも同様に、遺伝子変換により多様な配列が生み出されていることを確認した。

【表 2 3】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.935	VL	pVL102	VL
2	0.468	VL	pVL118	VL
3	0.271	Not matched	pVL102	VL
4	0.271*	pVL119	VL	VL
5	0.222	VL	VL	pVL129
6	0.172*	pVL119	VL	VL
7	0.172	VL	pVL105	VL
8	0.123	VL	pVL130	VL
9	0.098	Not matched	pVL122	VL
10	0.098	VL	pVL109	VL

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VLともpVLとも完全一致しない配列（部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる）

\*: CDR 以外の部分の配列が異なっている。

10

20

30

【表 2 4】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	6.393*	pVH112	Not matched	VH
2	0.586	pVH109	Not matched	VH
3	0.479	pVH108	Not matched	VH
4	0.479	pVH117	Not matched	VH
5	0.426	pVH107	Not matched	VH
6	0.320	pVH124	Not matched	VH
7	0.266*	pVH112	Not matched	VH
8	0.266	VH	Not matched	pVH109
9	0.160	Not matched	pVH125	VH
10	0.160*	pVH112	Not matched	VH

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH と pVH と完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR2 の配列が異なっている。

10

20

30

【表 2 5】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.293	VL	pVL109	VL
2	0.267	pVL119	VL	VL
3	0.187*	pVL105	VL	VL
4	0.160	VL	VL	pVL129
5	0.133	VL	pVL101	VL
6	0.133	VL	pVL118	VL
7	0.133	VL	VL	pVL127
8	0.107	pVL119	pVL119	VL
9	0.080	VL	VL	pVL123
10	0.080*	pVL105	VL	VL

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VL とも pVL とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR 以外の部分の配列が異なっている。

10

20

30

【表 2 6】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.867*	VH	Not matched	pVH109
2	0.819*	VH	Not matched	pVH109
3	0.819	VH	Not matched	pVH116
4	0.337	pVH109	Not matched	VH
5	0.241*	VH	Not matched	pVH109
6	0.193	pVH105	Not matched	VH
7	0.193	pVH117	Not matched	VH
8	0.145	pVH112	Not matched	VH
9	0.145	pVH126	Not matched	pVH116
10	0.096	pVH107	Not matched	pVH109

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH とも pVH とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR2 の配列が異なっている。

#### 【 0 0 9 4 】

RMCE法を利用して軽鎖に30個、重鎖に45個のヒト可変領域由来配列から成る偽遺伝子領域を挿入したL30/H15f15f15fおよびL30/H15r15r15f細胞株の作製

#### 3 0 . ベクターの作製

3 0 - 1 . トリ抗体重鎖 (IgM) 偽遺伝子領域へ、順向きに構築した偽遺伝子15個をさらに挿入

#### ( 1 ) ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列 (pVH15b)

データベース上のヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の配列に基づいてCDR1、CDR2、CDR3の配列を新たに15個選択し、pVH131 (配列番号 1 4 7)、pVH132 (配列番号 1 4 8)、pVH133 (配列番号 1 4 9)、pVH134 (配列番号 1 5 0)、pVH135 (配列番号 1 5 1)、pVH136 (配列番号 1 5 2)、pVH137 (配列番号 1 5 3)、pVH138 (配列番号 1 5 4)、pVH139 (配列番号 1 5 5)、pVH140 (配列番号 1 5 6)、pVH141 (配列番号 1 5 7)、pVH142 (配列番号 1 5 8)、pVH143 (配列番号 1 5 9)、pVH144 (配列番号 1 6 0)、pVH145 (配列番号 1 6 1) を順向きで連結させたpVH15b (配列番号 1 6 2) を作製した。

#### 【 0 0 9 5 】

#### ( 2 ) ベクターの構築

pUC57-Ampベクターに、loxm3 rev配列、プラスサイジン耐性遺伝子、SV40 early polyA terminator、SV40 polyadenylation region、loxm7 rev RE配列、pVH15b (順向き)、loxP for LE配列を挿入し、図 3 1 に示すようなベクターpVH15B-ver3\_RMCE2nd\_For (配列番号 1 6 3) を作製した。

## 【 0 0 9 6 】

3 0 - 2 . トリ抗体重鎖 ( IgM ) 偽遺伝子領域へ、逆向きに構築した偽遺伝子15個をさらに挿入

pUC57-Ampベクターに、loxm3 rev配列、プラストサイジン耐性遺伝子、SV40 early polyA terminator、SV40 polyadenylation region、loxm7 rev RE配列、pVH15b ( 逆向き )、loxP for LE配列を挿入し、図 3 1 に示すようなベクターpVH15B-ver3\_RMCE2nd\_Rev ( 配列番号 1 6 4 ) を作製した。

## 【 0 0 9 7 】

## 3 1 . 細胞株の作製

L30/H15f15f15f細胞株は、上記 2 で作製したL30/H15f15f細胞株に、上記 3 0 - 1 で調製したpVH15B-ver3\_RMCE2nd\_Forを導入して作製した。

pVH15B-ver3\_RMCE2nd\_For をCre\_pEGFP-C1とともに遺伝子導入して部位特異的組換えを誘導した後、10 µg/mL のプラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した細胞株2-1-3、2-1-11、1-n-1および2-n-3を得た。

L30/H15r15r15f細胞株は、上記 2 7 で作製したL30/H15r15f細胞株に、上記 2 7 - 2 で調製したpVH15B-ver3\_RMCE2nd\_Revを導入して作製した。

pVH15B-ver3\_RMCE2nd\_Rev をCre\_pEGFP-C1とともに遺伝子導入して部位特異的組換えを誘導した後、10 µg/mL のプラストサイジンを含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起きていることを確認した細胞株4-1-5、4-1-7および3-1-11を得た。

## 【 0 0 9 8 】

## 3 2 . 抗体発現の確認 ( フローサイトメトリー、ELISA )

## 3 2 - 1 . フローサイトメトリーによる解析

上記 3 に記載した方法に基づき、上記 3 1 で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図 3 2 および図 3 3 に示す。野生型のDT40ではトリIgMのみが発現しているのに対し、形質転換株の2-1-3、2-1-11、1-n-1、2-n-3 ( 以上、図 3 2 )、4-1-5、4-1-7 および3-1-11 ( 以上、図 3 3 ) においてはトリIgMの発現が消失し、代わりにヒトIg およびIg が発現していることを確認した。

## 【 0 0 9 9 】

## 3 2 - 2 . ELISAによる解析

上記 3 - 2 に記載されている方法に基づき、上記 3 1 で作製された細胞から分泌されている抗体の測定を行った。その結果を表 2 7 に示す。1 3 - 1 と同様、野生型のDT40ではトリIgMのみが分泌されているのに対し、形質転換株の2-1-3、2-1-11、1-n-1、2-n-3、4-1-5、4-1-7および3-1-11ではヒトIgG<sub>1</sub>が分泌されていることを確認した。

10

20

30

【表 2 7】

	ヒト IgG1 ( $\mu$ g/mL)	トリ IgM ( $\mu$ g/mL)
野生型	<0.01	2.33
2-1-3	0.36	<0.01
2-1-11	0.16	<0.01
1-n-1	0.18	<0.01
2-n-3	0.16	<0.01
4-1-5	0.37	<0.01
4-1-7	0.94	<0.01
3-1-11	1.31	<0.01

10

## 【 0 1 0 0 】

## 3 3 . 遺伝子変換の確認

20

上記 3 2 で抗体発現を確認した細胞株を用いて、遺伝子変換の確認を行った。TSA存在下で42日間培養した細胞株から、上記 4 に記載した方法に基づいて抽出したゲノムDNAを鋳型として、識別配列を付与したセンスプライマー（CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNNCAGTTCCCTGGTGCAGGC）（配列番号 4 6）とアンチセンスプライマー（CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCGTCAGCGCTCTCT）（配列番号 5 6）とを用いたPCRにより軽鎖可変領域を、センスプライマー（CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCGTCAGCGCTCTCT）（配列番号 5 6）と識別タグを付与したアンチセンスプライマー（CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNNNTGGGGGGGTTTCATATGAAG）（配列番号 5 7）とを用いたPCRにより重鎖可変領域を増幅した後、上記 4 に記載した方法に基づいて配列解析を行った。そのうち、2-1-3での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果（上位10個）をそれぞれ表 2 8 および表 2 9 に、3-1-11での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果（上位10個）をそれぞれ表 3 0 および表 3 1 に示す。軽鎖と重鎖のいずれの可変領域においても追加挿入したヒト偽遺伝子由来の配列を含むクローンが確認され、遺伝子変換により多様な配列が生み出されていることが示された。また、他の細胞株でも同様に、遺伝子変換により多様な配列が生み出されていることを確認した。

30

【表 2 8】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.882*	pVL119	VL	VL
2	0.428**	VL	pVL118	VL
3	0.241	pVL119	pVL119	VL
4	0.187**	VL	pVL118	VL
5	0.187**	VL	pVL118	VL
6	0.134	VL	pVL119	VL
7	0.134	VL	pVL109	VL
8	0.134	pVL105	VL	VL
9	0.107*	pVL119	VL	VL
10	0.080	VL	pVL105	VL

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VL とも pVL とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*, \*\*: CDR 以外の部分の配列が異なっている。

10

20

30

【表 29】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	2.226	pVH112	Not matched	VH
2	1.272	pVH109	Not matched	VH
3	0.636	VH	pVH112	VH
4	0.477	pVH144	Not matched	VH
5	0.477	pVH105	Not matched	VH
6	0.318	pVH145	Not matched	VH
7	0.318	pVH137	Not matched	VH
8	0.318*	pVH108	Not matched	VH
9	0.318*	pVH108	Not matched	VH
10	0.318	VH	Not matched	pVH116

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH と pVH と完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\* : CDR2 の配列が異なっている。

10

20

30

【表 3 0】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	1.000	pVL105	VL	VL
2	0.788	pVL119	VL	VL
3	0.515*	VL	pVL118	VL
4	0.455*	VL	pVL118	VL
5	0.182	VL	pVL105	VL
6	0.152**	pVL119	pVL119	VL
7	0.152	VL	pVL109	VL
8	0.121	VL	pVL104	VL
9	0.091**	pVL119	pVL119	VL
10	0.091	VL	pVL107	VL

10

20

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VL とも pVL とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*, \*\*: CDR 以外の部分の配列が異なっている。

【表 3 1】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	1.524	pVH109	Not matched	VH
2	1.220	pVH112	Not matched	VH
3	0.915	pVH117	Not matched	VH
4	0.915	pVH142	Not matched	VH
5	0.610	pVH108	Not matched	VH
6	0.610	pVH138	Not matched	VH
7	0.610	pVH107	Not matched	VH
8	0.457	pVH139	Not matched	VH
9	0.457	pVH102	Not matched	VH
10	0.457	pVH142	Not matched	Not matched

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH と pVH とともに完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

## 【 0 1 0 1】

RMCE法を利用して軽鎖に30個、重鎖に60個のヒト可変領域由来配列から成る偽遺伝子領域を挿入したL30/H15f15f15f15fおよびL30/H15r15r15r15f細胞株の作製

## 3 4 . ベクターの作製

3 4 - 1 . トリ抗体重鎖 (IgM) 偽遺伝子領域へ、順向きに構築した偽遺伝子15個をさらに挿入

## ( 1 ) ヒト抗体重鎖偽遺伝子配列 (pVH15c)

データベース上のヒトイムノグロブリン重鎖可変領域の配列に基づいてCDR1、CDR2、CD R 3の配列を新たに15個選択し、pVH146 (配列番号 1 6 5)、pVH147 (配列番号 1 6 6)、pVH148 (配列番号 1 6 7)、pVH149 (配列番号 1 6 8)、pVH150 (配列番号 1 6 9)、pVH151 (配列番号 1 7 0)、pVH152 (配列番号 1 7 1)、pVH153 (配列番号 1 7 2)、pV H154 (配列番号 1 7 3)、pVH155 (配列番号 1 7 4)、pVH156 (配列番号 1 7 5)、pVH1 57 (配列番号 1 7 6)、pVH158 (配列番号 1 7 7)、pVH159 (配列番号 1 7 8)、pVH160 (配列番号 1 7 9) を順向きで連結させたpVH15c (配列番号 1 8 0) を作製した。

## ( 2 ) ベクターの構築

pUC57-Ampベクターに、loxm3 rev配列、ネオマイシン耐性遺伝子、SV40 early polyA t erminator、SV40 polyadenylation region、loxP for RE配列、pVH15c (順向き)、loxm7 rev LE配列を挿入し、図 3 4 に示すようなベクターpVH15A \_RMCE1st\_Fw (配列番号 1 8 1) を作製した。

## 【 0 1 0 2】

3 4 - 2 . トリ抗体重鎖 (IgM) 偽遺伝子領域へ、逆向きに構築した偽遺伝子15個をさら

に挿入

pUC57-Ampベクターに、loxm3 rev配列、ネオマイシン耐性遺伝子、SV40 early polyA terminator、SV40 polyadenylation region、loxP for RE配列、pVH15c (逆向き)、loxm7 rev LE配列を挿入し、図34に示すようなベクターpVH15A\_RMCE1st\_Rv (配列番号182) を作製した。

【0103】

### 35. 細胞株の作製

L30/H15f15f15f15f細胞株は、上記31で作製したL30/H15f15f15f細胞株に、上記34-1で調製したpVH15A\_RMCE1st\_Fwを導入して作製した。

pVH15A\_RMCE1st\_Fw をCre\_pEGFP-C1とともに遺伝子導入して部位特異的組換えを誘導した後、2 mg/mL のG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起こっていることを確認した細胞株1n1-3, 1n1-4, 1n1-5を得た。

L30/H15r15r15r15f細胞株は、上記31で作製したL30/H15r15r15f細胞株に、上記34-2で調製したpVH15A\_RMCE1st\_Rvを導入して作製した。

【0104】

pVH15A\_RMCE1st\_Rv をCre\_pEGFP-C1とともに遺伝子導入して部位特異的組換えを誘導した後、2 mg/mL のG418を含む培地で培養し、生育した細胞についてPCRによるジェノタイピングを行って目的の遺伝子座で置換が起こっていることを確認した細胞株3111-1を得た。

【0105】

### 36. 抗体発現の確認 (フローサイトメトリー、ELISA)

#### 36-1. フローサイトメトリーによる解析

上記3に記載した方法に基づき、上記35で作製した細胞における抗体発現を確認した。その結果を図35に示す。野生型のDT40ではトリIgMのみが発現しているのに対し、形質転換株の1n1-3、1n1-4、1n1-5および3111-1においてはトリIgMの発現が消失し、代わりにヒトIg およびIg が発現していることを確認した (図35)。

【0106】

#### 36-2. ELISAによる解析

上記3-2に記載されている方法に基づき、上記35で作製された細胞から分泌されている抗体の測定を行った。その結果を表32に示す。13-1と同様、野生型のDT40ではトリIgMのみが分泌されているのに対し、形質転換株の1n1-3、1n1-4、1n1-5および3111-1ではヒトIgG<sub>1</sub>が分泌されていることを確認した。

【表32】

	ヒト IgG1 ( $\mu$ g/mL)	トリ IgM ( $\mu$ g/mL)
野生型	<0.01	2.33
1n1-3	0.32	<0.01
1n1-4	0.34	<0.01
1n1-5	0.22	<0.01
3111-1	0.49	<0.01

【0107】

### 37. 遺伝子変換の確認

上記36で抗体発現を確認した細胞株を用いて、遺伝子変換の確認を行った。TSA存在下で42日間培養した細胞株から、上記4に記載した方法に基づいて抽出したゲノムDNAを

鋳型として、識別配列を付与したセンスプライマー（CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNNCAGGTTCCCTGGTGCAGGC）（配列番号46）とアンチセンスプライマー（CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGGCTTGGTCCCTCCGCGAA）（配列番号47）とを用いたPCRにより軽鎖可変領域を、センスプライマー（CTATGCGCCTTGCCAGCCCCTCAGTCCGTCCAGCGCTCTCT）（配列番号56）と識別タグを付与したアンチセンスプライマー（CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNNTGGGGGGGGTTCATATGAAG）（配列番号57）とを用いたPCRにより重鎖可変領域を増幅した後、上記4に記載した方法に基づいて配列解析を行った。そのうち、1n1-3での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果（上位10個）をそれぞれ表33および表34に、3111-1での軽鎖および重鎖の可変領域の配列解析結果（上位10個）をそれぞれ表35および表36に示す。軽鎖と重鎖のいずれの可変領域においても追加挿入したヒト偽遺伝子由来の配列を含むクローンが確認され、より多様な配列が生み出されていることが示された。また、他の細胞株でも同様に、遺伝子変換により多様な配列が生み出されていることを確認した。

【表33】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	1.217	Not matched	pVL105	VL
2	0.466*	Not matched	pVL118	VL
3	0.304	pVL119	VL	VL
4	0.223**	pVL119	pVL119	VL
5	0.223*	Not matched	pVL118	VL
6	0.162	Not matched	pVL109	VL
7	0.162	pVL105	VL	VL
8	0.142	Not matched	pVL119	VL
9	0.081	Not matched	VL	pVL129
10	0.061**	pVL119	pVL119	VL

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

not matched: VLともpVLとも完全一致しない配列(部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR2の配列が異なっている。

\*\* : CDR以外の部分の配列が異なっている。

【表 3 4】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	63.115*	pVH105	Not matched	VH
2	2.186	pVH138	pVH138	VH
3	0.929	pVH124	Not matched	VH
4	0.820	pVH112	Not matched	VH
5	0.765*	pVH105	Not matched	VH
6	0.656*	pVH105	Not matched	VH
7	0.601	pVH155	Not matched	VH
8	0.601*	pVH105	Not matched	VH
9	0.546*	pVH105	Not matched	VH
10	0.492	pVH156	Not matched	VH

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH とも pVH とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR2 の配列が異なっている。

10

20

30

【表 3 5】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	0.142	VL	VL	pVL129
2	0.094	VL	VL	pVL128
3	0.071*	pVL119	VL	VL
4	0.047*	pVL119	VL	VL
5	0.024	Not matched	pVL107	pVL107
6	0.024	pVL108	pVL123	pVL123
7	0.024	pVL108	pVL108	pVL123
8	0.024*	pVL119	VL	VL
9	0.024	VL	VL	pVL125
10	0.024	VL	VL	pVL130

10

20

VL: 可変領域に挿入した配列

pVL: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VL とも pVL とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

\*: CDR 以外の部分の配列が異なっている。

【表 3 6】

#	%	CDR1	CDR2	CDR3
1	51.762*	pVH126	Not matched	VH
2	23.429	pVH108	Not matched	VH
3	1.053	pVH129	Not matched	VH
4	0.545*	pVH126	Not matched	VH
5	0.436*	pVH126	Not matched	VH
6	0.291	pVH104	Not matched	VH
7	0.291*	pVH126	Not matched	VH
8	0.291**	pVH126	Not matched	Not matched
9	0.254**	pVH126	Not matched	Not matched
10	0.254*	pVH126	Not matched	VH

10

20

VH: 可変領域に挿入した配列

pVH: 偽遺伝子領域に挿入した配列

Not matched: VH とも pVH とも完全一致しない配列 (部分的な遺伝子組換えや突然変異によるものと考えられる)

30

\*: CDR2 の配列が異なっている。

\*\* : CDR2, CDR3 の配列が異なっている。

### 【 0 1 0 8 】

#### 抗体セレクション 1

##### 3 8 . 抗原の調製

抗原タンパク質として、Plexin A4を選択した。Plexin A4はPlexin A typeに属する分子で、感覚神経や交感神経の軸索伸展を制御する因子として知られている。

抗原にはPlexin A4のSemaドメインおよびPSI (Plexin-Semaphorin-Integrin) ドメインのC末端にFLAGタグを付加したもの (アミノ酸配列を配列番号 6 8 に示す) を用いた。ACCESSION No. NM\_020911およびACCESSION No. EAW83796に基づいて、配列番号 6 7 に示す塩基配列を合成し、pCEP4 (ライフテクノロジーズ社、V044-50) のEBNA-1遺伝子およびHygromycin耐性遺伝子を欠失させた発現ベクターに挿入し、Plexin A4発現ベクターを構築した。

40

得られたPlexin A4発現ベクターをFreeStyle 293 F細胞 (ライフテクノロジーズ社、R790-07) にPEI (ポリエチレンジアミン) を用いて導入し、発現させた。その際、別途EBNA-1遺伝子の発現ベクターも同時に導入した。発現は3Lスケール、培養は7日間行った。

FLAGタグを利用して培養上清中の目的タンパク質を精製した。XK16/20カラム (GEヘルスケア社、28-9889-37) にanti-M2-agarose樹脂 (シグマ社、A2220) を2.5 mL充填し、D-PBS(-) (和光純薬、045-29795) で平衡化した後、培養上清をロードし、D-PBS(-) で洗浄

50

した後0.1 mg/mLのFLAGペプチド(シグマ社、F3290)を含むD-PBS(-)で溶出した。280 nmの吸光度でモニターして、ピークに相当する画分を回収し、SDS-PAGEおよびCBB染色により回収されたタンパク質の分子量を確認し、目的タンパク質の分子量と一致することを確認した。

限外ろ過膜(アミコン社、UFC0801008)を用いて約24 mLの回収画分を2 mLに濃縮し、Hi Load 16/600 Superdex 200 pg(GEヘルスケア社、28-9893-35)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った。D-PBS(-)でカラムを平衡化した後、回収画分をロードし、D-PBS(-)で溶出した。280 nmの吸光度でモニターして、ピークに相当する画分を回収し、SDS-PAGEおよびCBB染色により回収されたタンパク質の分子量を確認した。

【0109】

### 39. 抗体の選択

#### 39-1. 抗原磁気ビーズの作製

磁気ビーズはDynabeads M-270 Carboxylic Acid(ライフテクノロジーズ社、14305D)およびDynabeads M-270 Epoxy(ライフテクノロジーズ社、14301)を用い、抗原との結合は解説書に従った。この際、磁気スタンドはMPC-S(ライフテクノロジーズ社、DBA13346)を用いた。Dynabeads M-270 Carboxylic Acidについては、ビーズ10  $\mu$ Lを20  $\mu$ Lの25mM MES(pH5.0)で3回洗浄した後、50 mg/mLのNHS溶液と50 mg/mLのEDC溶液を10  $\mu$ Lずつ加え、室温で30分反応させた後、20  $\mu$ Lの25 mM MES(pH5.0)で2回洗浄した。この磁気ビーズ懸濁液から上清を除いた後、25 mM MES(pH5.0)で0.6 mg/mLに調製したPlexin A4タンパク質溶液を10  $\mu$ L添加し、4 で一晩、回転攪拌しながら反応させた。上清を除いた後、クエンチングバッファー(50 mM Tris-HCl)20  $\mu$ Lを加え、室温で15分間、回転攪拌しながら反応させた。Dynabeads M-270 Epoxyについては、ビーズ10  $\mu$ Lを20  $\mu$ Lの100 mM Na-phosphate bufferで3回洗浄した後、100 mM Na-phosphate bufferで0.45 mg/mlに調製したPlexin A4タンパク質溶液13.3  $\mu$ Lならびに3 M 硫酸アンモニウムを含む100 mM Na-phosphate buffer 6.7  $\mu$ Lを添加して懸濁し、37 で一晩、回転攪拌しながら反応させた。2種類のビーズは上清を除いたのちにセレクションバッファー(1% BSAを含むPBS)1 mLにまとめて懸濁し、同バッファーで3回洗浄した後、200  $\mu$ Lのセレクションバッファーに懸濁して、セレクションに供した。

【0110】

#### 39-2. 抗原磁気ビーズによるセレクション

L15/H15細胞株であるB7-3を、2.5 ng/mLのTSAを含む培地で3週間培養した後、約 $1 \times 10^8$ 個の細胞をセレクションバッファー10 mLにより洗浄し、上清を除いた後にセレクションバッファー1 mLで洗浄し、その後950  $\mu$ Lのセレクションバッファーに懸濁した。この細胞懸濁液に、上記17-1で調製した抗原磁気ビーズ50  $\mu$ Lを加え、4 で30分間、回転により攪拌しながら反応させた。KingFisher ml(Thermo社、5400050)を用い、0.5 mLのセレクションバッファーで3回洗浄した。その後回収した細胞を20 mLの培地で懸濁した後、9cmディッシュに播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで7日間培養した。

【0111】

#### 39-3. フローサイトメトリーによるスクリーニング

上記39-2の細胞培養液を回収し、 $3 \times 10^6$ 個の細胞を1.5 mLチューブに分取して遠心により上清を除去し、1.5 mLのPBSで洗浄し、上清を除いた。EZ-Link(登録商標)NHS-PEG4-Biotinylation Kit(PIERCE社、21455)を用いてビオチン標識したPlexinA4タンパク質を調製し、1次染色液(2.5  $\mu$ g/mLのビオチン標識Plexin A4タンパク質溶液)を300  $\mu$ L添加し、4 遮光にて60分静置した。遠心により上清を除き、500  $\mu$ LのPBSで2回洗浄した後、Goat Anti-Human IgG gamma chain specific R-FITC conjugated(Southern biotech社、A2040-02)とStreptavidin PE conjugated(eBioscience社、12-4317-87)をバッファーでそれぞれ1000倍または500倍希釈になるよう調製した2次染色液を300  $\mu$ L添加し、4 遮光にて60分静置した。遠心により上清を除き、500  $\mu$ LのPBSで2回洗浄した後、500  $\mu$ LのFACSバッファー(PBSで1000倍希釈したPI溶液(Invitrogen社、P3566)を含む)で懸濁した。このサンプルについてフローサイトメトリー解析を行った。その結果を図36

10

20

30

40

50

に示す。Plexin A4タンパク質とIgG のシグナルがいずれも高いP5のエリアの細胞集団を確認した。

#### 【 0 1 1 2 】

#### 3 9 - 4 . 抗原固定ELISA法によるスクリーニング

上記 3 9 - 3 の細胞培養上清を回収し、Plexin A4抗原を用いた抗原固定ELISA法により、Plexin A4抗原に反応するクローンのスクリーニングを行った。

まず、2.5 µg/mLのPlexin A4抗原タンパク質および陰性対照であるトリプシンインヒター（シグマ社、T6522）、ストレプトアビジン（ナカライテスク社、32243）またはオボアルブミン（シグマ社、A5503）の溶液20 µLをイムノ384ウェルプレートマキシソープ（Nunc社、464718）に分注し、4 で一晩反応させ、プレートに固相化した。その後、洗浄液（0.05 % Tween20を含むPBS）で3回洗浄し、ブロッキング液（1 % BSAを含むPBS）45 µLを加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄し、測定試料を25 µL加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄し、Goat anti-Human IgG-Fc HRP-conjugated（Bethyl社、A80-104P）をPBS緩衝液で2000倍に希釈したものを25 µL加え、1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄し、TMB+（Dako社、S159985）25 µLを加え、5分発色反応させ、1 M硫酸25 µLを加えて反応を停止させた。Infinite M1000（TECAN社）を用いて、450 nmの吸光度を測定した。その結果を図 3 7 に示す。ほとんどのクローンでPlexin A4に特異的に反応する抗体が産生されていることが示された。

#### 【 0 1 1 3 】

上記 3 9 - 3 に記載したフローサイトメトリーと上記 3 9 - 4 に記載した抗原固定ELISA法を組み合わせたスクリーニングにより、Plexin A4に特異的に結合する陽性クローンを同定することができた。なお、B7-3以外に、L15/H30細胞株の#11-6、L30/H30細胞株の7-7-48-10を用いたセクションにおいても、Plexin A4に特異的に結合する陽性クローンを同定することができた。

#### 【 0 1 1 4 】

#### 4 0 . 抗Plexin A4抗体の発現確認

#### 4 0 - 1 . ELISAによる解析

上記 3 9 - 4 で同定した陽性クローンのうち、#62および#20について、培養上清中に分泌されているトリIgMおよびヒトIgG<sub>1</sub>の濃度の測定を行った。それぞれの細胞株を、ニワトリ血清を含まない培地で4 × 10<sup>5</sup> cells/mLに懸濁した後、24-well プレートに1 mLずつ播種し、3日間培養した後、培養液を回収し、0.22 µm filterで濾過した後、測定に用いた。

IgGの測定方法は以下の通りである。PBSで1.0 µg/mLに希釈調製したGoat anti-Human IgG-Fc affinity purified（Bethyl社、A80-104A）100 µLを F96 マキシソープNuncイムノプレート（Nunc社、464718）に分注し4 で1時間以上反応させ、プレートに固相化した。その後、洗浄液（0.05 % Tween20を含むPBS）で5回洗浄し、ブロッキング液（1 % BSAを含むPBS）200 µLを加え、室温で95分間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、測定試料または標準物質となるHuman IgG1 Lambda-UNLB（SouthernBiotech社、0151L-01）を100 µL加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、Goat anti-Human IgG-Fc HRP conjugated（Bethyl社、A80-104P）をPBSで1000倍に希釈したものを100 µL加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄し、TMB+（Dako社、S159985）100 µLを加え、室温で3分発色反応させ、1 M硫酸20 µLを加えて反応を停止させた。Infinite M1000（TECAN社）を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

IgMの測定方法は以下の通りである。PBSで1.0 µg/mLに希釈したGoat anti-chicken IgM（Bethyl社、A30-102A）100 µLをF96マキシソープ Nuncイムノプレート（Nunc社、439454）に分注し、4 で一晩反応させ、プレート上に固相化した。その後、洗浄液（0.05 % Tween20を含むPBS）で5回洗浄し、ブロッキング液（1 % BSAを含むPBS）200 µLを加え、室温で95分間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、測定試料または標準物質となるトリ血清（GIBCO社、16110）を100 µL加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、Goat anti-chicken IgM HRP conjugated（Bethyl社、A30-102P）を1 % BSAおよび0.05 % Tween

10

20

30

40

50

20を含むPBSで5000倍に希釈したものを100  $\mu$ L加え、室温で1時間反応させた。洗浄液で5回洗浄し、TMB+ (Dako社、S159985) 100  $\mu$ Lを加え、室温で3分発色反応させ、1 N硫酸100  $\mu$ Lを加えて反応を停止させた。Infinite M1000 (TECAN社)を用いて、450 nmの吸光度を測定した。

測定結果を表37に示す。クローン#20およびクローン#62において、ヒトIgG<sub>1</sub>が分泌されていること、トリIgMの分泌はごくわずかであることを確認した。

【0115】

【表37】

クローン名	IgG ( $\mu$ g/mL)	IgM ( $\mu$ g/mL)
#62	5.79	0.186
#20	1.54	0.231

10

【0116】

#### 40-2. ウェスタンブロット法による解析

ウェスタンブロット法により、39-4で得られた抗原反応性抗体を産生する陽性クローンである#62および#20から分泌されている抗体の分析を行った。

それぞれの細胞株を、ニワトリ血清を含まない培地で $4 \times 10^5$  cells/mLに懸濁した後、24-wellプレートに1 mLずつ播種し、3日間培養した後、細胞株の培養液を回収し、0.2  $\mu$ mフィルター(ミリポア社、SLGV J13 SL)で濾過した。Ig およびIg の検出用にはProtein Aカラムで精製したサンプルを、IgMの検出用には精製前のサンプルを用いた。還元条件での検出に用いるサンプル(還元サンプル)については、トリス-SDS-メルカプトエタノールサンプル処理液(コスモバイオ社、423437)を、非還元条件での検出に用いるサンプル(非還元サンプル)については、トリス-SDSサンプル処理液(コスモバイオ社、423420)をそれぞれ等量加えて混合した。その後、還元サンプルは98、3分間、非還元サンプルは37、30分間反応させた後、4~20%ポリアクリルアミドゲル(コスモバイオ社、414879)で電気泳動し、ナイロンメンブレンに転写後、ブロッキングバッファー(1% BSAを含むPBS)でブロッキングし、1次抗体(Goat Anti-Human IgG-Fc Fragment Ab-HRP (Bethyl社、A80-104P)、Goat Anti-Human IgG Lambda-HRP (Southern Biotech社、2070-05)、Goat Anti-chicken IgM-HRP (Bethyl社、A30-102P)を反応させた。0.1% Tween 20を含むPBSで3回洗浄した後、ECL plus (GEヘルスケア社、RPN2132)による化学発光でトリIgM、ヒトIg (重鎖)、ヒトIg (軽鎖)を検出した。その結果を図38~図40に示す。抗Ig 抗体でのウェスタンブロットでは、還元状態で55 kDa、非還元状態では約160 kDaのバンドが検出された(図38)。抗Ig 抗体でのウェスタンブロットでは、還元状態で25 kDa、非還元状態では約160 kDaのバンドが検出された(図39)。また、抗IgM抗体でのウェスタンブロットではシグナルが検出されなかった(図40)。

20

30

これにより、得られた陽性クローンが産生する抗体が完全長のヒト抗体であることを確認した。

40

【0117】

#### 抗体セレクション2

##### 41. 抗原の調製

抗原タンパク質として、Semaphorin 3A (Sema3A)を選択した。Sema3AはSema3ファミリーに属する分子で、感覚神経や交感神経の軸索伸展を制御する因子として知られている。

抗原にはSema3AのN末端にHisタグとヒトアルカリフォスファターゼ(AP)を付したHis-AP-hSema3A(配列番号183)を用いた。このタンパク質を発現する安定発現株HEK293は横浜市立大学医学部分子薬理神経生物学教室より提供された。

50

発現は4Lスケール、培養は4日間行った。Hisタグを利用して培養上清中の目的タンパク質を精製した。HisTrap EXCEL 5mL (GEヘルスケア社, 17-3712-06)をA液(20 mM Na-phosphate, 150 mM NaCl, 20 mM Imidazole (pH7.5))で平衡化した後、培養上清をロードし、A液で洗浄した。その後、A液からB液(20 mM Na-phosphate, 150 mM NaCl, 500 mM Imidazole (pH7.5))に25カラム容量で直線的に置き換わるグラジエントによって溶出した。280 nmの吸光度でモニターして、ピークに相当する画分を回収し、SDS-PAGEおよびCBB染色により回収されたタンパク質の分子量を確認し、目的タンパク質の分子量と一致することを確認した。

限外ろ過膜(アミコン社、UFC0801008)を用いて約80 mLの回収画分を1.5 mLにまで濃縮し、Hi Load 16/600 Superdex 200 pg (GEヘルスケア社, 28-9893-35)を用いてゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った。溶出バッファー(50 mM Na-phosphate, 300 mM NaCl, 400 mM Arginine, pH7.0)でカラムを平衡化した後、回収画分をロードし、溶出バッファーで溶出した。280 nmの吸光度でモニターして、ピークに相当する画分を回収し、SDS-PAGEおよびCBB染色により回収されたタンパク質の分子量を確認した。次いで、溶離液中のアルギニンを除去するために、D-PBS(-)で2度目のゲルろ過クロマトグラフィーを行った。同様に280 nmの吸光度でモニターして、ピークに相当する画分を回収し、SDS-PAGEおよびCBB染色により回収されたタンパク質の分子量を確認した。

#### 【 0 1 1 8 】

### 4 2 . 抗体の選択

#### 4 2 - 1 . 抗原磁気ビーズの作製

磁気ビーズはDynabeads M-270 Carboxylic Acid (ライフテクノロジーズ社、14305D)、Dynabeads M-270 Epoxy (ライフテクノロジーズ社、14301)およびDynabeads His-Tag Isolation & Pulldown (ライフテクノロジーズ社、10103D)を用い、抗原との結合は解説書に従った。この際、磁気スタンドはMPC-S (ライフテクノロジーズ社、DBA13346)を用いた。Dynabeads M-270 Carboxylic Acidについては、ビーズ40  $\mu$ Lを80  $\mu$ Lの25 mM MES (pH5.0)で3回洗浄した後、50 mg/mLのNHS溶液と50 mg/mLのEDC溶液を40  $\mu$ Lずつ加え、室温で30分反応させた後、80  $\mu$ Lの25 mM MES (pH5.0)で2回洗浄した。この磁気ビーズ懸濁液から上清を除いた後、ポジティブセレクション用には25 mM MES (pH5.0)で0.475 mg/mLに調製したHis-AP-hSema3Aタンパク質溶液を50.6  $\mu$ Lを、ネガティブセレクション用には抗原溶液の代わりにPBSを使用して25 mM MES (pH 5.0)で希釈した溶液50.6  $\mu$ Lを添加して懸濁し、4 で一晩、回転攪拌しながら反応させた。上清を除いた後、クエンチングバッファー(50 mM Tris-HCl)80  $\mu$ Lを加え、室温で15分間、回転攪拌しながら反応させた。Dynabeads M-270 Epoxyについては、ビーズ40  $\mu$ Lを80  $\mu$ Lの100 mM Na-phosphate bufferで3回洗浄した後、ポジティブセレクション用には100 mM Na-phosphate bufferで0.45 mg/mLに調製したHis-AP-hSema3Aタンパク質溶液53.3  $\mu$ Lならびに3 M 硫酸アンモニウムを含む100 mM Na-phosphate buffer 26.7  $\mu$ Lを、ネガティブセレクション用には抗原溶液の代わりにPBSを使用して25 mM MES (pH 5.0)で希釈した溶液53.3  $\mu$ Lならびに3 M 硫酸アンモニウムを含む100 mM Na-phosphate buffer 26.7  $\mu$ Lを添加して懸濁し、37 で一晩、回転攪拌しながら反応させた。Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldownについては、ビーズ8  $\mu$ Lを80  $\mu$ LのPBSで3回洗浄した後、ポジティブセレクション用には抗原濃度4.49  $\mu$ MのHis-AP-hSema3Aタンパク質溶液101.9  $\mu$ L、ネガティブセレクション用には抗原溶液の代わりにPBSを101.9  $\mu$ L添加して懸濁し、4 で10分間回転攪拌しながら反応させた。3種類のビーズは上清を除いたのちにセレクションバッファー(1% BSAを含むPBS)1 mLにまとめて懸濁し、同バッファーで3回洗浄した後、200  $\mu$ Lのセレクションバッファーに懸濁して、セレクションに供した。

#### 【 0 1 1 9 】

#### 4 2 - 2 . 抗原磁気ビーズによるセレクション

L15/H15細胞株であるB7-3を、2.5 ng/mLのTSAを含む培地で86日間培養した後、約 $1.5 \times 10^7$ 個の細胞をセレクションバッファー10 mLにより洗浄し、上清を除いた後にセレクションバッファー1 mLで洗浄し、その後950  $\mu$ Lのセレクションバッファーに懸濁した。こ

の細胞懸濁液に、上記39-1で調製したネガティブセレクション用抗原磁気ビーズ50 $\mu$ Lを加え、4で30分間、回転により攪拌しながら反応させた。KingFisher mL (Thermo社、5400050)を用いて磁気ビーズを取り除いた後、細胞懸濁液にポジティブセレクション用抗原磁気ビーズを50 $\mu$ L加え、4で30分間回転拡販しながら反応させた。KingFisher mL (Thermo社、5400050)を用い、1.7 mLのセレクションバッファーで3回洗浄した。その後回収した細胞を20 mLの培地で懸濁した後、96ウェルプレート1枚に播種し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。

【0120】

42-3. 1次スクリーニング

上記42-2の細胞培養液を回収し抗原固定ELISAにおける分泌IgGの抗原反応性に基づき、標的抗原に対して特異的に反応するクローンのスクリーニングを行った。PBSで2.5 $\mu$ g/mLに調製した抗原タンパク質および陰性対照抗原溶液 (His-Ubiquitin, Ovalbumin, Streptavidin) 20 $\mu$ Lをイムノ384ウェルプレートマキシソープ (Nunc社、464718) に分注し、4で一晩反応させて固相化した。洗浄溶液 (0.05% Tween20を含むPBS) で5回洗浄し、ブロッキング溶液 (1% BSAを含むPBS) を45 $\mu$ L加えて室温で115分間反応させた。洗浄溶液で5回洗浄し、培養上清を25 $\mu$ L加えて室温で130分間反応させた。洗浄溶液で5回洗浄し、ブロッキング溶液で2000倍に希釈したGoat anti-Human IgG-Fc HRP-conjugatedを25 $\mu$ L加えて室温で47分間反応させた。洗浄溶液で5回洗浄し、TMB+ (Dako社、S159985) を25 $\mu$ L加えて5分反応させた。1 N硫酸を25 $\mu$ L加えて反応を停止させた後、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸光度を測定した (図41)。吸光度0.1以上、S/N比5倍以上の細胞を陽性と判定し、2次スクリーニングに供した。

【0121】

42-4. 2次スクリーニング

上記42-3の細胞培養上清を回収し、42-3記載の方法に基づき抗原固定ELISAによる2次スクリーニングを行った。吸光度0.5以上、S/N比5倍以上の細胞を陽性と判定し、モノクローン化を行った。

【0122】

42-5. モノクローン化後の1次スクリーニング

上記42-4の細胞培養上清を回収し、42-3記載の方法に基づき抗原固定ELISAによるスクリーニングを行った。吸光度0.2以上、S/N比5倍以上の細胞を陽性と判定し、2次スクリーニングに供した。

【0123】

42-6. モノクローン化後の2次スクリーニング

上記42-5の細胞培養上清を回収し、42-3記載の方法に基づき抗原固定ELISAによるスクリーニングを行った。吸光度0.5以上、S/N比5倍以上の陽性クローン#64、#69および#77を選択した (図42)。

【0124】

43. 抗His-AP-hSema3A抗体の発現確認

43-1. ELISAによる解析

上記42-6で選択された陽性クローンのうち、#64について、培養上清中に分泌されているトリIgMおよびヒトIgG<sub>1</sub>の濃度の測定を行った。測定法は上記40-1に従った。

測定結果を表38に示す。野生型のDT40と同様に、陽性クローン#64からヒトIgGが分泌されていること、トリIgMの分泌は認められないことを確認した。

【表38】

クローン名	IgG ( $\mu$ g/mL)	トリ IgM ( $\mu$ g/mL)
#64	2.66	<0.0005

【0125】

#### 4 3 - 2 . ウェスタンブロット法による解析

ウェスタンブロット法により、上記 4 2 - 6 で得られた抗原反応性抗体を産生する陽性クローン#64から分泌されている抗体の分析を行った。

それぞれの細胞株を、ニワトリ血清を含まない培地で  $4 \times 10^5$  cells/mL に懸濁した後、9cm ディッシュに 20 mL 播種し、4日間培養した後、細胞株の培養液を回収し、0.22  $\mu$ m フィルター（ミリポア社、SLGV J13 SL）で濾過した。Ig および Ig の検出用には Protein A カラムで精製したサンプルを、IgM の検出用には精製前のサンプルを用いた。還元条件での検出に用いるサンプル（還元サンプル）については、トリス-SDS-メルカプトエタノールサンプル処理液（コスモバイオ社、423437）を、非還元条件での検出に用いるサンプル（非還元サンプル）については、トリス-SDS サンプル処理液（コスモバイオ、423420）をそれぞれ等量加えて混合した。その後、還元サンプルは 98 ， 3 分間、非還元サンプルは 37 ， 30 分間反応させた後、XV PANTERA 5-20% T-HCL 10W（DRC、NXV-275HP）で電気泳動し、PVDF 膜に転写後、ブロッキングバッファー（5 % スキムミルクおよび 0.1 % Tween 20 を含む TBS）でブロッキングし、1 次抗体（Goat Anti-Human IgG-Fc Fragment Ab-HRP（Bethyl 社、A80-104P）、Goat Anti-Human IgG Lambda-HRP（Southern Biotech 社、2070-05）を反応させた。0.1 % Tween 20 を含む TBS で 3 回洗浄した後、Luminata Forte Western HRP substrate（ミリポア社、WBLUF0100）による化学発光でトリ IgM、ヒト Ig（重鎖）、ヒト Ig（軽鎖）を検出した。その結果を図 4 3 に示す。抗 Ig 抗体でのウェスタンブロットでは、還元状態で 55 kDa（図 4 3 A）、非還元状態では約 160 kDa のバンドが検出された（図 4 3 B）。抗 Ig 抗体でのウェスタンブロットでは、還元状態で 25 kDa（図 4 3 C）、非還元状態では約 160 kDa のバンドが検出された（図 4 3 D）。

これにより、得られた陽性クローンが産生する抗体が完全長のヒト抗体であることを確認した。

#### 【 0 1 2 6 】

#### 抗体セレクション 3

##### 4 4 . 抗原の調製

抗原タンパク質として、IL-8 を選択した。IL-8 は、ケモカインの一種であり、好中球や T リンパ球に対して走化性を示し、白血球の血管内皮細胞への接着や好中球の機能を促進する活性を持つ。そのため、好中球の浸潤を伴う炎症疾患、関節リウマチなどに関与していると考えられている。

抗原は、セレクションにおいてはヒト IL-8（Immune TECH 社、IT-401-003P）を、スクリーニングにおいては 2 種類のヒト IL-8（Immune TECH 社、IT-401-003P および CELL Signaling Technology 社、8921LF）を用いた。

#### 【 0 1 2 7 】

##### 4 5 . 抗体の選択

##### 4 5 - 1 . 抗原磁気ビーズの作製

磁気ビーズは Dynabeads M-270 Carboxylic Acid（ライフテクノロジーズ社、14305D）、Dynabeads M-270 Epoxy（ライフテクノロジーズ社、14301）および Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown（ライフテクノロジーズ社、10103D）を用い、抗原との結合は解説書に従った。この際、磁気スタンドは MPC-S（ライフテクノロジーズ社、DBA13346）を用いた。Dynabeads M-270 Carboxylic Acid については、ビーズ 35  $\mu$ L を 70  $\mu$ L の 25 mM MES（pH 5.0）で 3 回洗浄した後、50 mg/mL の NHS 溶液と 50 mg/mL の EDC 溶液を 35  $\mu$ L ずつ加え、室温で 30 分反応させた後、70  $\mu$ L の 25 mM MES（pH 5.0）で 2 回洗浄した。この磁気ビーズ懸濁液から上清を除いた後、ポジティブセレクション用には 25 mM MES（pH 5.0）で 0.6 mg/mL に調製した IL-8（Immune TECH 社、IT-401-003P）タンパク質溶液 35  $\mu$ L を、ネガティブセレクション用には抗原溶液の代わりに PBS を使用して 25 mM MES（pH 5.0）で希釈した溶液 35  $\mu$ L を添加して懸濁し、4 で一晩、回転攪拌しながら反応させた。上清を除いた後、クエンチングバッファー（50 mM Tris-HCl）70  $\mu$ L を加え、室温で 15 分間、回転攪拌しながら反応させた。Dynabeads M-270 Epoxy については、ビーズ 35  $\mu$ L を 70  $\mu$ L の 100 mM Na-phosphate buffer で 3 回洗浄した後、ポジティブセレクション用には 100 mM Na-phosphate buff

erで0.45 mg/mLに調製したIL-8タンパク質溶液46.7  $\mu$ Lならびに3 M 硫酸アンモニウムを含む100 mM Na-phosphate buffer 23.3  $\mu$ Lを、ネガティブセレクション用には抗原溶液の代わりにPBSを使用して100 mM Na-phosphate bufferで希釈した溶液46.7  $\mu$ Lならびに3 M 硫酸アンモニウムを含む100 mM Na-phosphate buffer 23.3  $\mu$ Lを添加して懸濁し、37 で一晩、回転攪拌しながら反応させた。Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldownについては、ビーズ7  $\mu$ Lを70  $\mu$ LのPBSで3回洗浄した後、ポジティブセレクション用には抗原濃度5.75  $\mu$ MのIL-8タンパク質溶液70  $\mu$ L、ネガティブセレクション用には抗原溶液の代わりにPBSを70  $\mu$ L添加して懸濁し、4 で210分間回転攪拌しながら反応させた。3種類のビーズは上清を除いたのちにセレクションバッファー(1% BSAを含むPBS)1 mLにまとめて懸濁し、同バッファーで3回洗浄した後、700  $\mu$ Lのセレクションバッファーに懸濁して、セレクションに供した。

10

## 【0128】

## 45-2. 抗原磁気ビーズによるセレクション

L30/H15f15f15f細胞株である2-1-3を、2.5 ng/mLのTSAを含む培地で45日間培養した後、約 $1.5 \times 10^7$ 個の細胞をセレクションバッファー10 mLにより洗浄し、上清を除いた後にセレクションバッファー10 mLで洗浄し、その後950  $\mu$ Lのセレクションバッファーに懸濁した。この細胞懸濁液に、上記39-1で調製したネガティブセレクション用抗原磁気ビーズ50  $\mu$ Lを加え、4 で30分間、回転により攪拌しながら反応させた。KingFisher mL (Thermo社、5400050)を用いて磁気ビーズを取り除いた後、細胞懸濁液にポジティブセレクション用抗原磁気ビーズを50  $\mu$ L加え、4 で30分間回転攪拌しながら反応させた。KingFisher mL (Thermo社、5400050)を用い、1.7 mLのセレクションバッファーで3回洗浄した。その後回収した細胞を20 mLの培地で懸濁した後、96ウェルプレート1枚に播種し、CO<sub>2</sub>インキュベータで培養した。

20

## 【0129】

## 45-3. スクリーニングおよび陽性クローンの同定

上記42-3~42-6と同様に、2度のスクリーニング、モノクローン化、2度のスクリーニングを実施し、陽性クローン#117、#121および#123を得た。セレクション後の1次スクリーニングの結果を図44に、モノクローン化後の2次スクリーニングの結果を図45に示す。

## 【0130】

## 46. 抗IL-8抗体の発現確認

## 46-1. ELISAによる解析

上記45-3で得られた抗原反応性抗体を産生する陽性クローンである#117および#121について、培養上清中に分泌されているトリIgMおよびヒトIgG<sub>1</sub>の濃度の測定を行った。測定法は上記40-1に従った。

測定結果を表39に示す。野生型のDT40と同様に、陽性クローン#117および#121からヒトIgGが分泌されていること、トリIgMの分泌は認められないことを確認した。

## 【表39】

クローン名	IgG ( $\mu$ g/mL)	IgM ( $\mu$ g/mL)
#117	3.65	<0.041
#121	3.7	<0.041

40

## 【0131】

## 46-2. ウェスタンブロット法による解析

ウェスタンブロット法により、#117、#121から分泌されている抗体の分析を行った。方法は上記40-2に従った。

その結果を図46に示す。抗Ig抗体でのウェスタンブロットでは、還元状態で55 kDa

50

(図46A)、非還元状態では約160 kDaのバンドが検出された(図46B)。抗Ig 抗体でのウェスタンブロットでは、還元状態で25 kDa(図46C)、非還元状態では約160 kDaのバンドが検出された(図46D)。

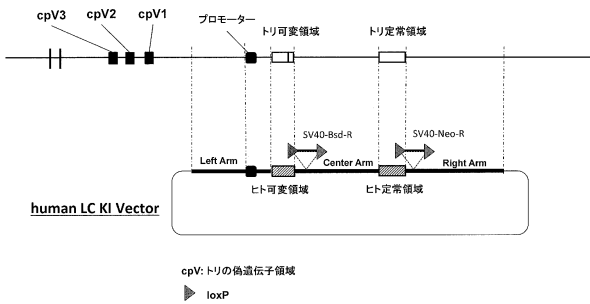
これにより、得られた陽性クローンが産生する抗体が完全長のヒト抗体であることを確認した。

【産業上の利用可能性】

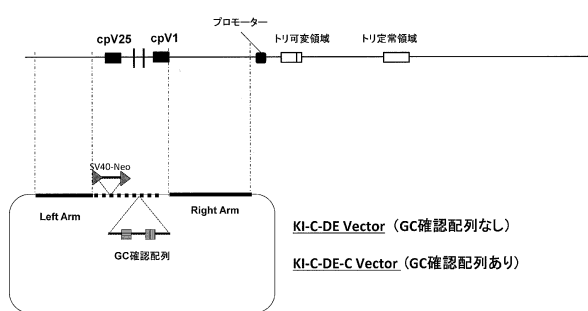
【0132】

本発明は、多様なヒト抗体を迅速に作製する方法に関するものである。抗体医薬の重要性に鑑み、今後の創薬、医療の分野において、所望の薬効を示すパイオ医薬品、特に抗体医薬の開発に際し、本発明が提供する技術は、極めて重要な役割を担うものとして期待される。

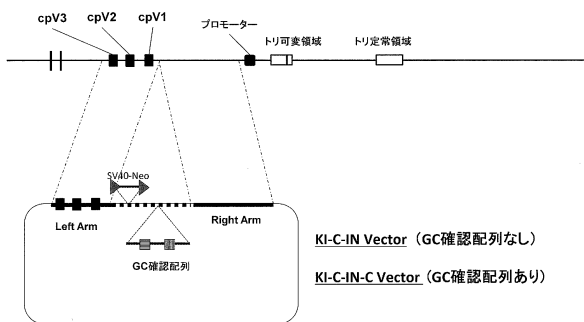
【図1】



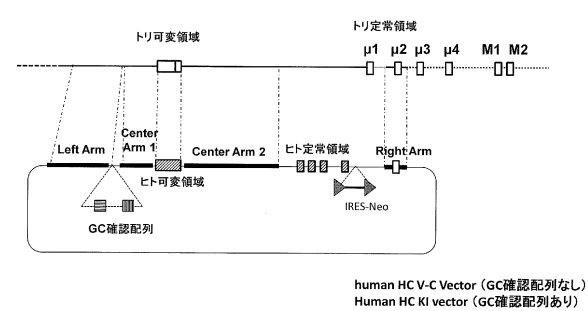
【図3】



【図2】

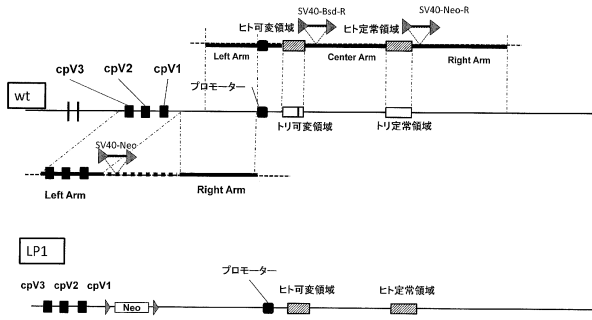


【図4】

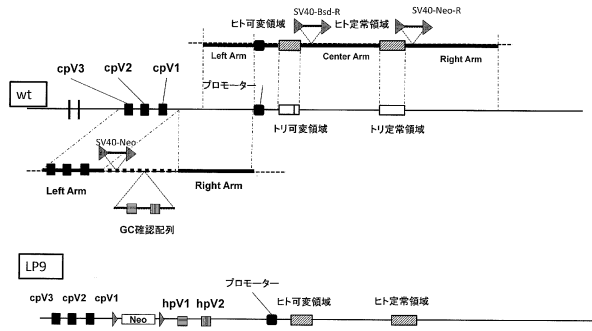


human HC V-C Vector (GC確認配列なし)  
Human HC KI vector (GC確認配列あり)

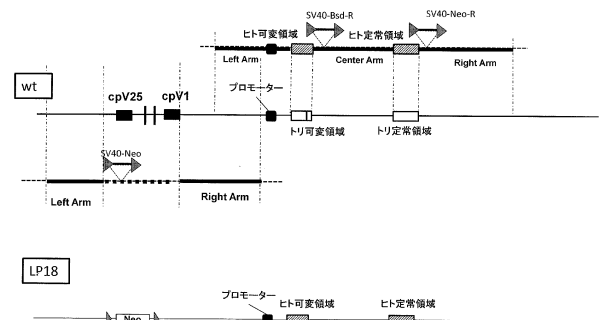
【図5】



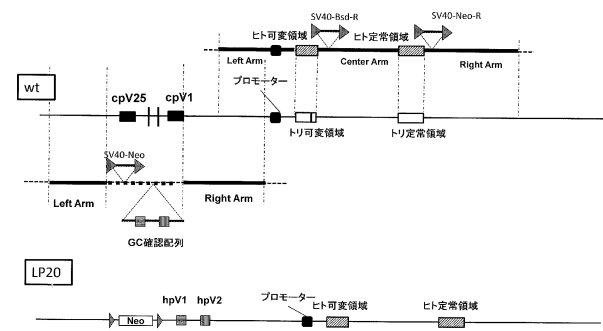
【図6】



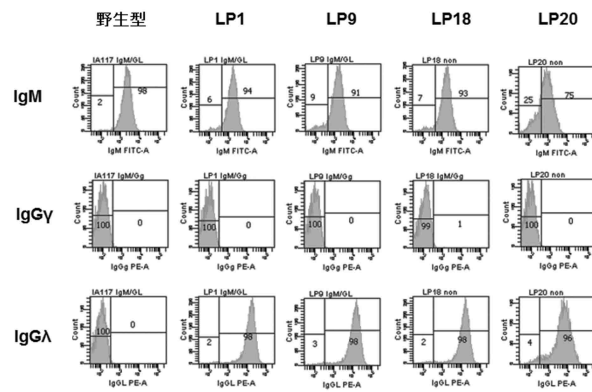
【図7】



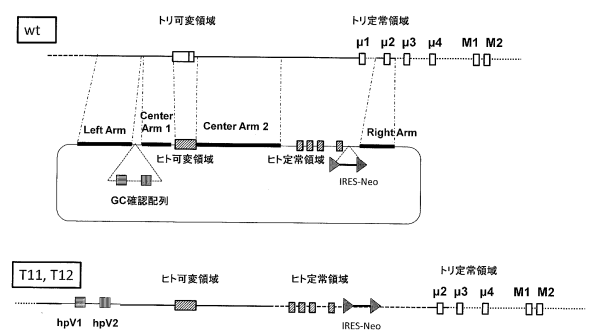
【図8】



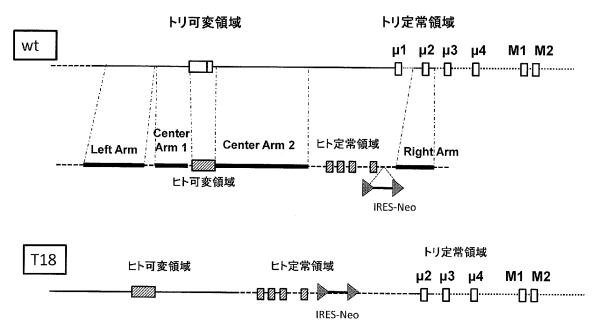
【図9】



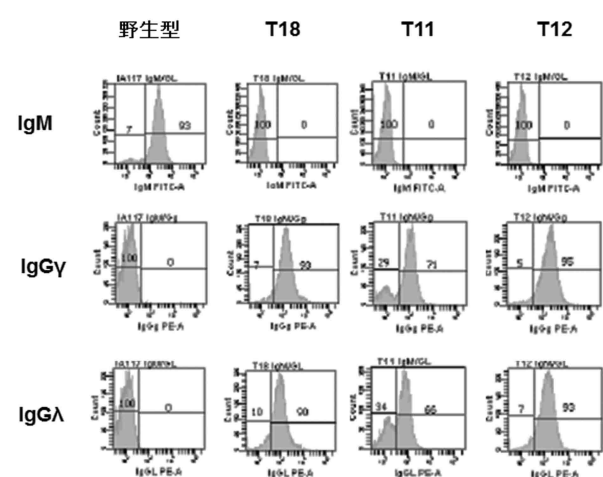
【図11】



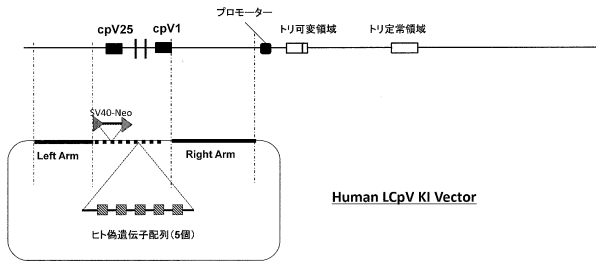
【図10】



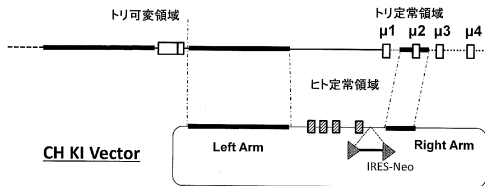
【図12】



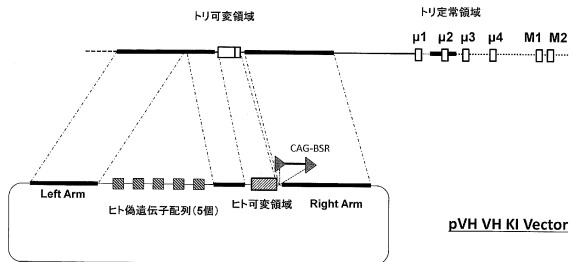
【図13】



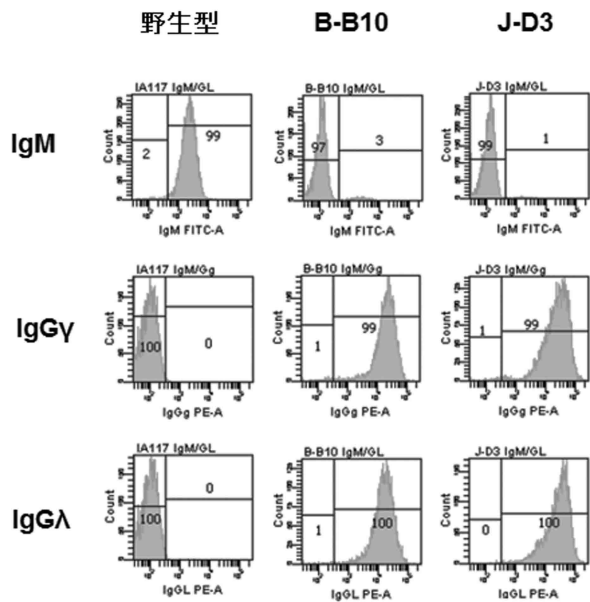
【図14】



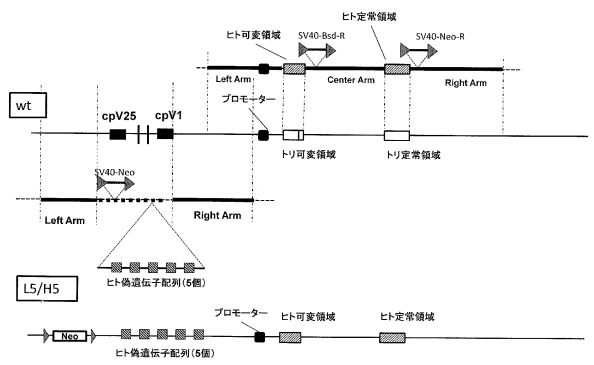
【図15】



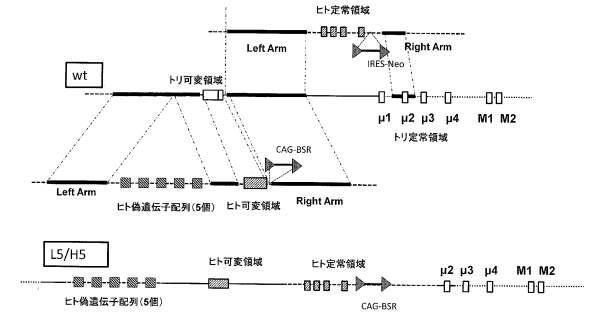
【図18】



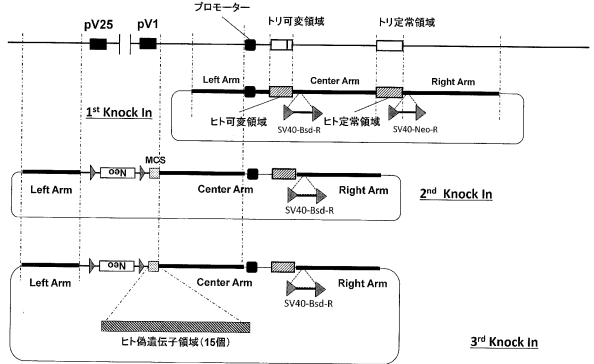
【図16】



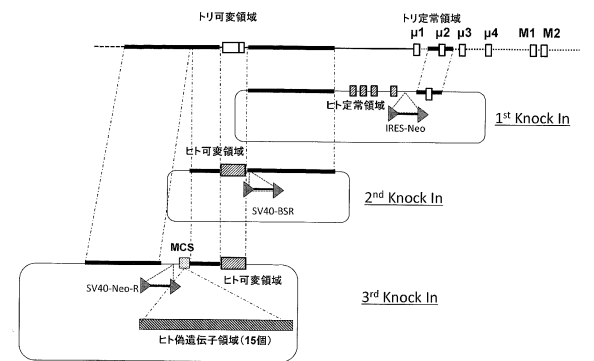
【図17】



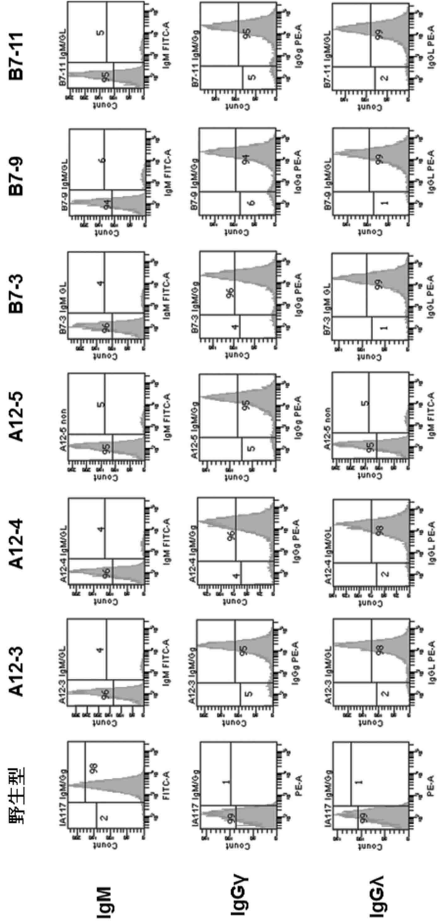
【図19】



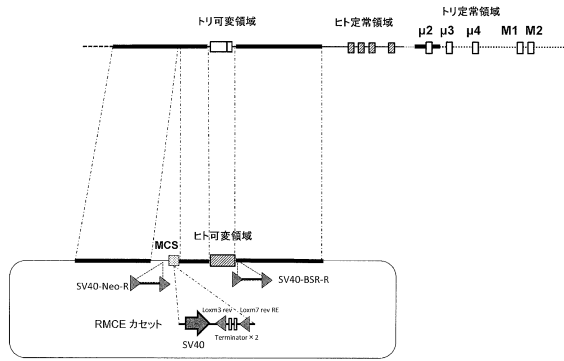
【図20】



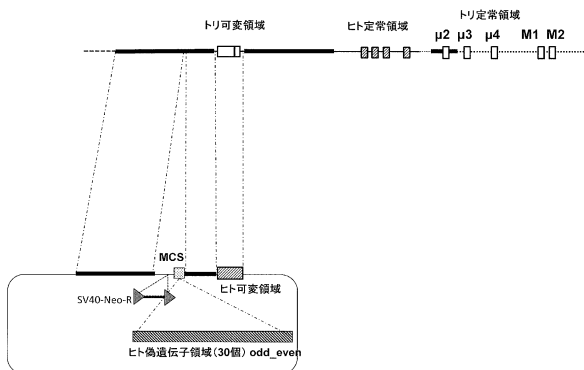
【 2 1 】



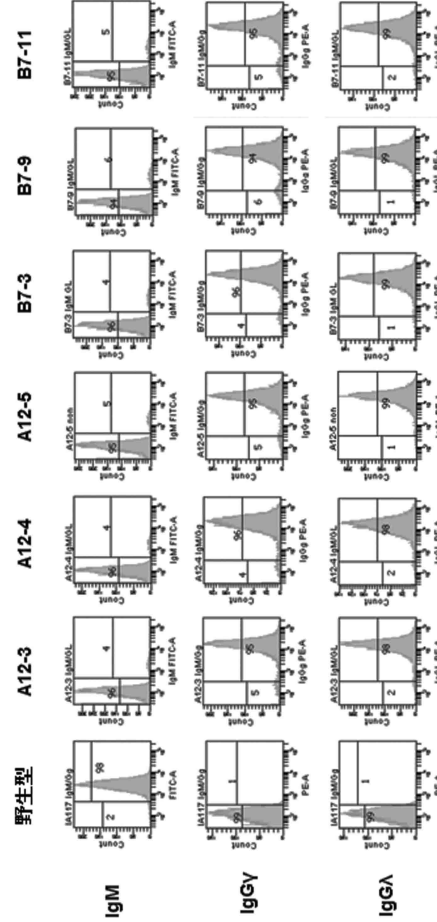
【 2 3 】



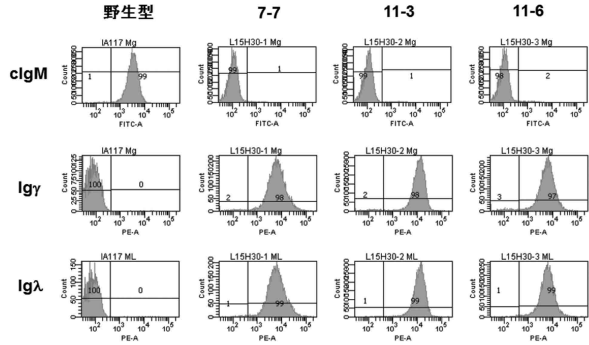
【 2 4 】



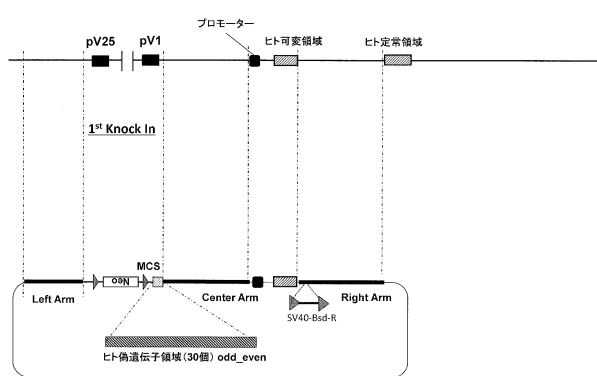
【 2 2 】



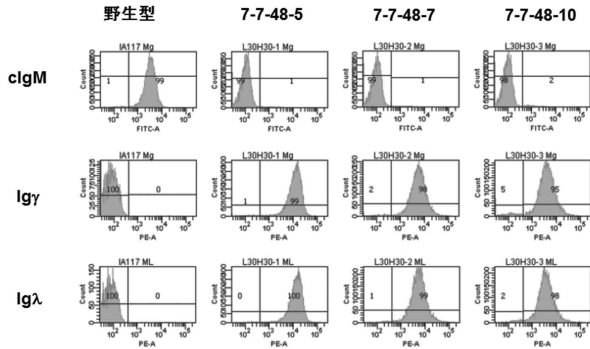
【 2 5 】



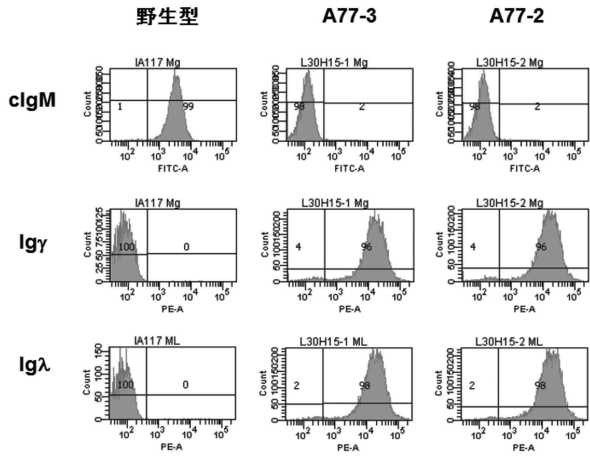
【 2 6 】



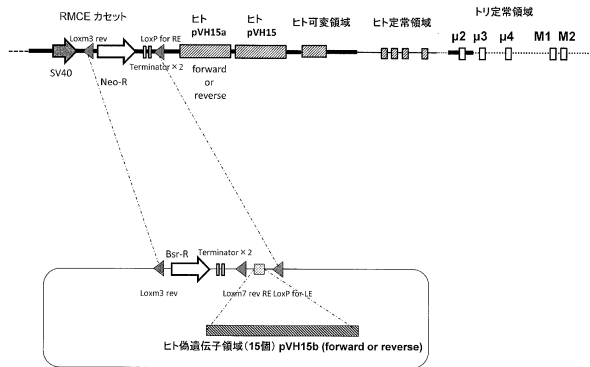
【 図 27 】



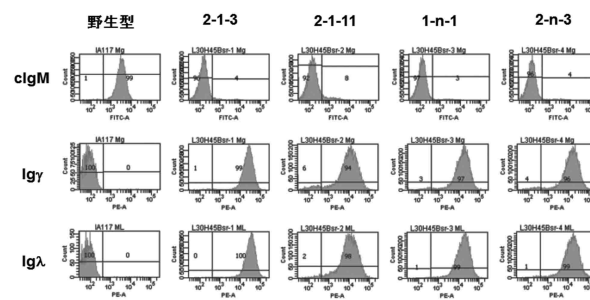
【 図 28 】



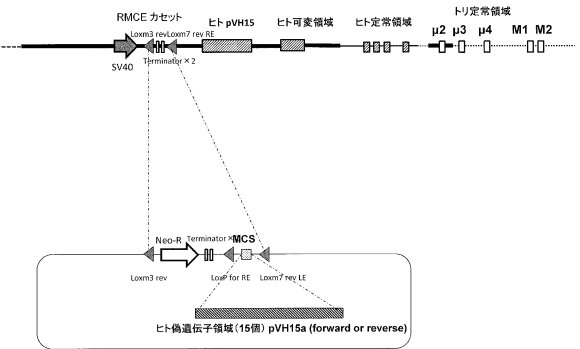
【 図 31 】



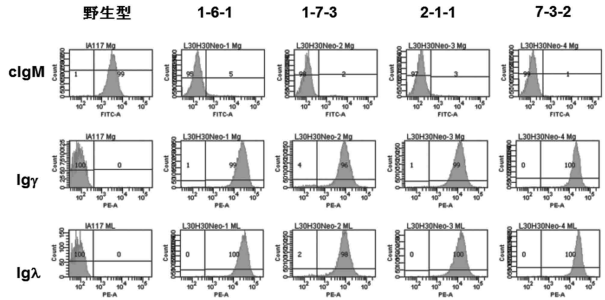
【 図 32 】



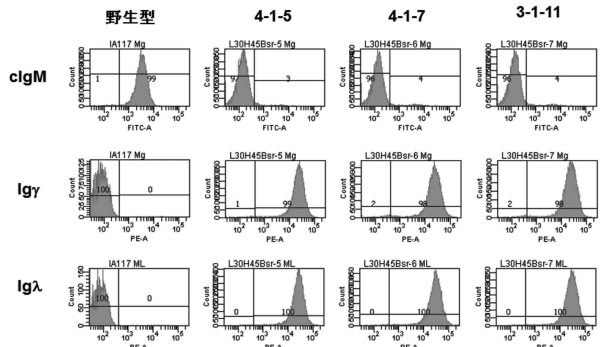
【 図 29 】



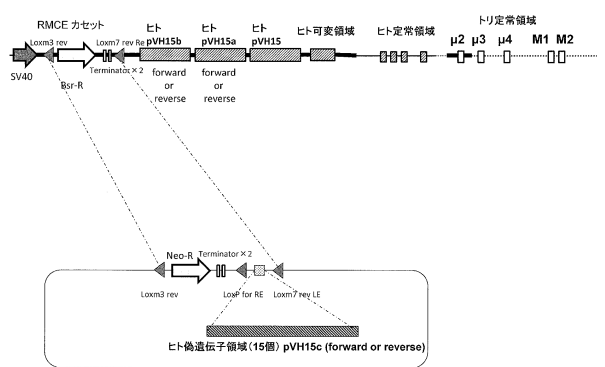
【 図 30 】



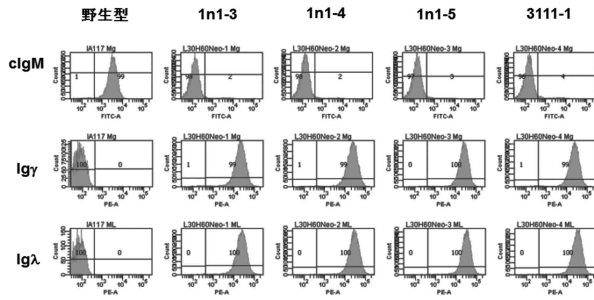
【 図 33 】



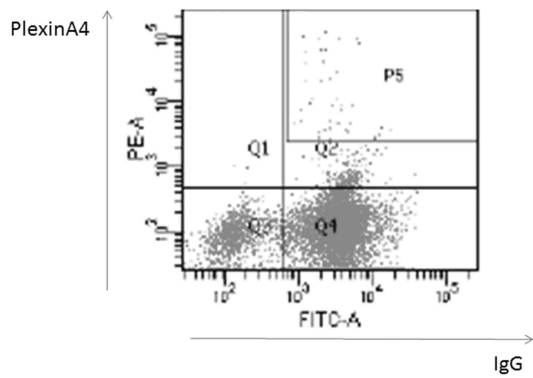
【 図 34 】



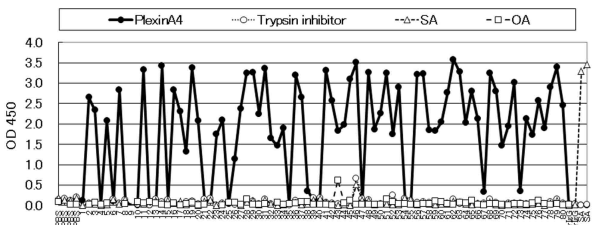
【 図 3 5 】



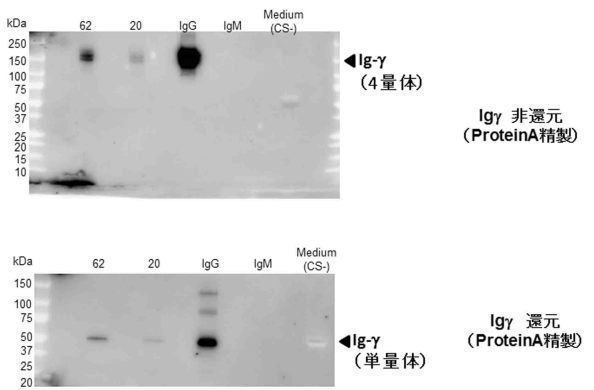
【 図 3 6 】



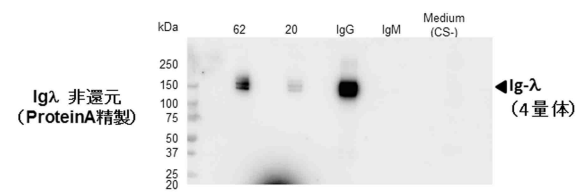
【 図 3 7 】



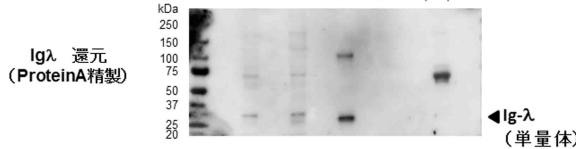
【 図 3 8 】



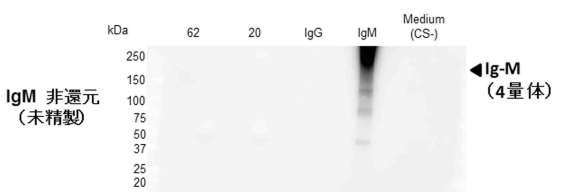
【 図 3 9 】



【 図 3 10 】



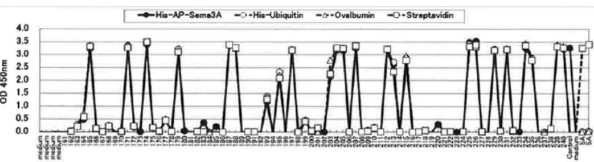
【 図 4 0 】



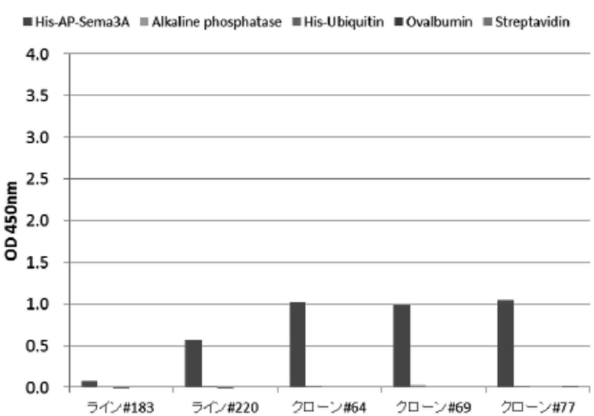
【 図 4 1 】



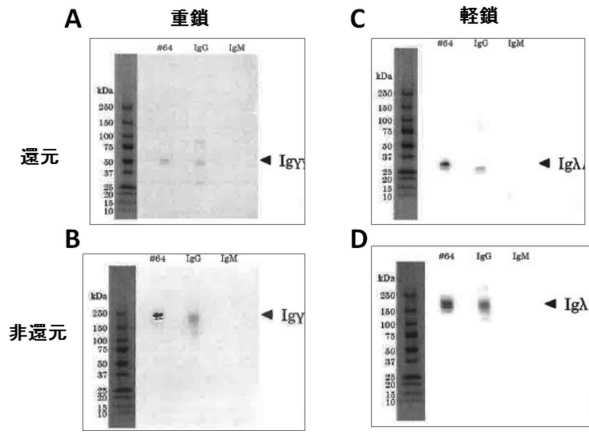
【 図 4 1 】



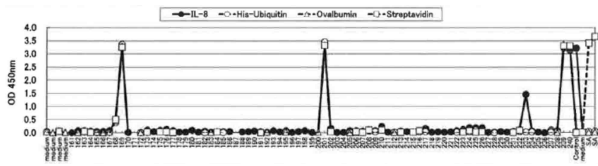
【 図 4 2 】



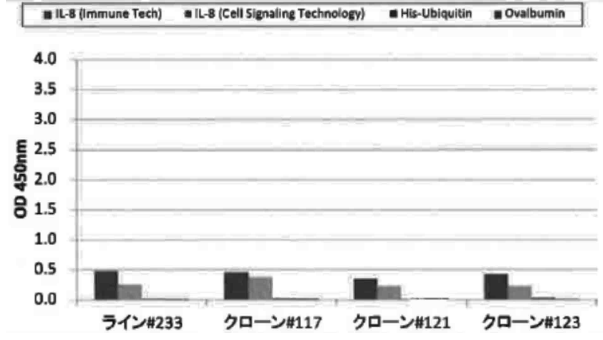
【 図 4 3 】



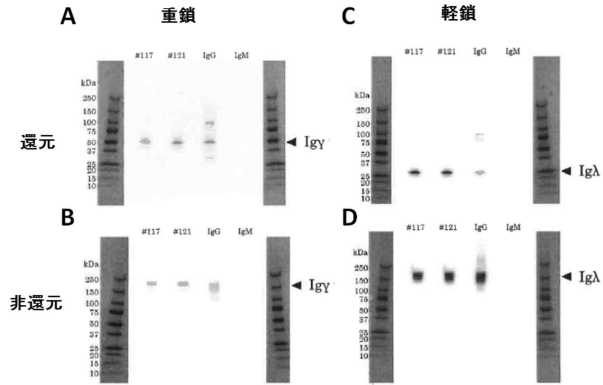
【 図 4 4 】



【 図 4 5 】



【 図 4 6 】



【 配列表 】

0006721502000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 4 0 B 40/02 (2006.01) C 4 0 B 40/02

- (72)発明者 川田 滋久  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号  
 ンス内 株式会社カイオム・バイオサイエ
- (72)発明者 浅越 健二郎  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号  
 ンス内 株式会社カイオム・バイオサイエ
- (72)発明者 矢吹 崇吏  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号  
 ンス内 株式会社カイオム・バイオサイエ
- (72)発明者 佐野 瞳  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号  
 ンス内 株式会社カイオム・バイオサイエ
- (72)発明者 宮井 俊輔  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号  
 ンス内 株式会社カイオム・バイオサイエ
- (72)発明者 高橋 直樹  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号  
 ンス内 株式会社カイオム・バイオサイエ
- (72)発明者 武居 亜希  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号  
 ンス内 株式会社カイオム・バイオサイエ
- (72)発明者 澤田 篤志  
 東京都渋谷区本町三丁目12番1号  
 ンス内 株式会社カイオム・バイオサイエ

審査官 福間 信子

- (56)参考文献 特表2013-501525(JP,A)  
 国際公開第2012/067188(WO,A1)  
 特開2008-099602(JP,A)  
 特開2011-103876(JP,A)  
 理研発バイオベンチャー株式会社カイオム・バイオサイエンスの起業, 大学発ベンチャー創出に  
 に向けたシンポジウム, 2013, p.1-19  
 PLoS One, 2013, vol.8, no.11, p.e80108

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0  
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )  
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )