

貪食を利用した
不要細胞除去モダリティの開発

大和 勇輝

目次

要旨	5
略語表.....	6
第1章 序論	7
1-1 不要細胞の蓄積と疾患、ホスファチジルセリンを介した死細胞貪食機構	7
1-2 不要細胞除去のための既存技術	7
1-3 死細胞貪食機構.....	8
1-4 死細胞貪食機構を介した新規貪食誘導分子の開発	8
1-5 本研究の目的	9
第2章 材料と方法.....	10
2-1 マウス	10
2-2 細胞株と培養方法	10
2-3 プラスミドの設計	10
2-4 細胞株の樹立	11
2-5 <i>Rosa26^{GFPm-OVA}</i> マウスの樹立	11
2-6 Crunch タンパク質の生産.....	13
2-6-1 Crunch 高発現細胞株作製.....	13
2-6-2 培養上清中タンパク質の His タグ精製手法の最適化.....	13
2-6-3 Crunch の発現精製	15
2-6-4 Crunch シグナル配列スクリーニング	16
2-7 大腸菌組み換えタンパク質の生産.....	16
2-8 HPLC	16
2-8 フローサイトメトリー(FACS)	16
2-8-1 抗体を用いた培養細胞解析	16
2-8-2 抗体を用いた生体由来細胞解析	17
2-8-3 Crunch 結合の検出(Crunch 結合アッセイ)	17
2-9 SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング(WB).....	17
2-10 ELISA.....	18
2-11 微分走査蛍光測定法 (Differential Scanning Fluorimetry: DSF)	19
2-12 Split-GFP アッセイによる二量体化 MerTK 検出.....	19
2-13 リン酸化アッセイ	19
2-14 細胞生存アッセイ	21
2-15 貪食アッセイ	23
2-16 脾細胞移植.....	23
2-17 生体内貪食アッセイ	23
2-18 生体内半減期および抗薬物抗体(ADA)アッセイ	24

2-19 免疫原性予測	25
2-20 マクロファージ刺激アッセイ	25
2-21 腫瘍移植マウスモデル	27
2-22 腫瘍転移モデル	27
2-23 ヒトメラノーマ腫瘍微小環境における免疫細胞解析	27
2-24 B16F10 移植モデルにおける MerTK 発現細胞解析	27
2-25 タンパク質構造予測	28
2-26 B 細胞除去モデル	28
2-27 アデノ随伴ウイルス 9(AAV9)	28
2-28 全身性エリテマトーデス(SLE)モデル	30
2-29 腎臓組織学解析および免疫複合体沈着	30
2-30 尿中蛋白／クレアチニン比 (UPC)	30
2-31 抗核抗体 (ANA) および抗 dsDNA 抗体	30
2-32 統計解析	31
第3章 結果	32
3-1 Crunch の設計および調製	32
3-1-1 貪食細胞と不要細胞を橋渡しするプロテイン S の改変	32
3-1-2 Crunch 生産技術の確立	33
3-1-3 モデル標的細胞の作製	35
3-1-4 Crunch のタンパク質特性	36
3-2 培養系における Crunch の実証	37
3-2-1 MerTK の貪食シグナル伝達	37
3-2-2 Crunch による MerTK 二量体化の誘導	37
3-2-3 Crunch による MerTK リン酸化の誘導	39
3-2-4 Crunch による MerTK 下流シグナルの誘導	40
3-2-5 Crunch による標的細胞の貪食誘導	41
3-3 生体系における Crunch の実証	43
3-3-1 脾細胞移植マウスモデルにおける生体内からの標的細胞除去	43
3-3-2 腫瘍移植マウスモデルにおける生体内からの標的細胞除去	45
3-4 Crunch の薬物動態プロファイル	48
3-4-1 Crunch の生体内半減期	48
3-4-2 Crunch の安全性試験	49
3-5 内在性分子の標的化および治療応用	52
3-5-1 一本鎖抗体(scFv)への応用	52
3-5-2 Crunch におけるナノボディと scFv の性質	54
3-5-3 内在性分子標的 Crunch の生体内標的細胞除去	56

3-5-4 Crunch と既存医薬品の比較	57
3-5-5 AAV を用いた Crunch システム	59
3-5-6 Crunch の薬力学	60
3-6 内在性分子を標的化した治療戦略	62
3-6-1 Crunch による TYRP1 を標的としたメラノーマ治療	62
3-6-2 Crunch による CD19 を標的とした全身性エリテマトーデス(SLE)治療	63
第4章 考察	66
4-1 Crunch の臨床的意義	66
4-2 Crunch の技術的課題	66
4-2-1 生産技術の向上	66
4-2-2 生体内半減期	66
4-2-3 安全性	67
4-2-4 エフェクター細胞	68
4-3 Crunch の展望	68
4-3-1 治療プラットフォーム	68
4-3-2 既存医薬品との比較	69
4-3-3 実験ツールとしての Crunch	69
4-3-4 高度な標的化	69
文献	71
謝辞	80

要旨

ヒトの生体内では、日々数千億もの細胞が生まれ、死に、そして貪食細胞によって体内から除去されている。アポトーシスを起こした死細胞は細胞膜外葉にホスファチジルセリン (PtdSer) を "Eat-me" シグナルとして露出する。貪食細胞は、自身の細胞膜に発現する貪食受容体の MerTK と、それに結合する血清タンパク質であるプロテイン S (ProS) を介して死細胞上の PtdSer に結合、認識し、貪食を引き起こす。この死細胞貪食機構は、毎日数千億個もの死細胞を除去することができる優れた不要細胞除去機構である。

一方で、加齢とともに、本来不要な細胞が細胞死を起こせず体内に蓄積し疾患を発症する。生体内からこれらの不要な細胞（がん細胞や自己免疫細胞等）を除去する多くの優れた技術がこれまで開発されてきた。例えば、低分子化合物は、がん細胞のチロシンキナーゼを阻害し、がん細胞を殺傷する。また、標的細胞と T 細胞を会合させる二重特異性抗体は T 細胞による標的細胞の殺傷を誘導する。さらに、細胞療法である CAR-T 細胞は、遺伝子工学的にキメラ抗原受容体 (CAR) を発現させた T 細胞が標的細胞を殺傷する。しかしながら、これらの治療法が効かない病態や、未だに治療法が確立されていない疾患は依然として多い。そこで本研究では、新たな治療法開発を目的として、上記の生体が持つ優れた死細胞除去機構に着目し、標的とする不要細胞を除去するための新規モダリティの開発を目指した。

本研究では、MerTK と PtdSer の両方に結合し、貪食を誘導する貪食誘導分子 ProS の機能に着目し、PtdSer 結合モチーフを標的分子結合分子に置き換えることで、ProS の標的細胞をアポトーシス細胞から任意の不要細胞とする改変を行った新規貪食誘導分子 Crunch (Connector for Removal Unwanted Cell Habitat) を設計した。はじめに、遺伝子工学的アプローチにより、実験に十分な量の Crunch タンパク質を調製するプラットフォームを構築した。標的細胞モデルにおいては、GFP ナノボディを融合させた Crunch (GFPNb-Crunch) によって GFP を細胞表面に発現した細胞を不要細胞として除去する実験系を構築し、Proof of concept の達成を目指した。GFPNb-Crunch は、培養系において、ProS と同様に標的細胞存在下で MerTK の二量体化、リン酸化、シグナル誘導を行い、貪食を誘導することが確認された。さらに、GFP を細胞表面に発現する脾細胞、悪性黒色腫の移植モデルにおいて、GFPNb-Crunch がモデル不要細胞を貪食によって除去することが確認された。次に、Crunch が内在性の因子を標的化可能か確認するため、B 細胞表面に発現する CD19 および悪性黒色腫の細胞表面に発現する TYRP1 を標的とした scFv を融合する scCD19-Crunch、scTYRP1-Crunch を作製し、全身性エリテマトーデスモデル、悪性黒色腫担癌モデルで薬効を評価したところ、病態の有意な改善が確認された。また、Crunch の治療応用性を目的として、薬物動態試験や安全性試験、ヒト応用性試験を行い、Crunch の薬物特性を確認した。

本研究は、新規貪食誘導分子 Crunch を設計し、製法の最適化、培養細胞における薬物メカニズム試験、マウスモデルでの複数病態モデルを用いた薬効評価、薬物特性の評価、ヒト応用性の Proof of Concept を行い、新規不要細胞除去ツールとして新たな治療法開発に貢献する点において意義があると考えられる。

略語表

PtdSer : Phosphatidylserine
MerTK : Tyrosine-protein kinase Mer
ProS : Protein S
CAR : Chimeric Antigen Receptors
Crunch : Connector for Removal Unwanted Cell Habitat
EGF : Epidermal growth factor
SHBG : sex-hormone-binding globulin
scFv : single chain variable fragment
ADCC : Antibody-dependent cellular cytotoxicity
CDC : Complement-dependent cytotoxicity
GFPm : Membrane expressing GFP
OVA : OVAbumin
GFPNb-Crunch : Crunch fused with GFP nanobody
scGFP-Crunch : Crunch fused with GFP scFv
scCD19-Crunch : Crunch fused with mouse CD19 scFv
scTYRP1-Crunch : Crunch fused with human/mouse TYRP1 scFv
FACS : Fluorescence-activated cell sorting
LPS ; Lipopolysaccharide
ADA : anti-drug antibody
DSF : Differential Scanning Fluorimetry
sfGFP : superfolder GFP
aXkr4 : activated-Xkr4
AAV : Adeno-associated virus
SLE : Systemic Lupus Erythematosus
TAM : Tyro3, Axl, MerTK
CAF : Cancer-Associated Fibroblast
MFI : Mean Fluorescence Intensity

第1章 序論

1-1 不要細胞の蓄積と疾患、ホスファチジルセリンを介した死細胞貪食機構

我々の生体内では、毎日数千億を超える細胞が生まれ、細胞死および貪食細胞により排除されている(1)。胸腺での選択や、リンパ球による標的化、老化などなんらかの要因でアポトーシスを起こした死細胞は、細胞膜外葉にホスファチジルセリン(PtdSer)を”Eat-me”シグナルとして露出する(2)。貪食細胞はこの PtdSer を速やかに認識し、貪食を行い、そして死細胞を分解する(3)。この迅速な死細胞貪食機構は、死細胞の内容物の放出による炎症を抑え、組織の恒常性を維持し、我々の身体の健康を支えている。この死細胞貪食機構には、マクロファージや樹状細胞といったプロフェッショナルな貪食細胞だけではなく、内皮細胞や上皮細胞、繊維芽細胞などのノンプロフェッショナルな貪食細胞も参加しており、生体内の様々な場所で、多くの細胞が参加することで毎日数千億個の死細胞を処理している非常に優れたシステムである。この死細胞貪食機構の破綻は不要細胞の蓄積を引き起こし、疾患の引き金となる。例えば、アポトーシスによる排除を逃れた自己免疫性リンパ球の蓄積は、自己免疫性疾患を引き起こす。老化細胞や、機能変異細胞、死細胞の蓄積は、臓器の機能低下や、がんなど疾患の原因となる(4-6)。

1-2 不要細胞除去のための既存技術

生体内からこれらの不要な細胞(がん細胞や自己免疫細胞等)を除去する多くの低分子化合物や抗体が医薬品として上市されてきた。例えば、低分子化合物は、がん細胞のチロシンキナーゼを阻害し、がん細胞を殺傷する(7)。抗体による標的化は、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)や補体依存性細胞傷害活性(CDC)を、標的分子を発現する細胞(がん細胞など)に特異的に引き起こさせることで、標的細胞を殺傷する(8, 9)。しかしながら、低分子化合物は標的細胞特異性を持たないため副作用の可能性が大きく、また抗体は標的化する分子の種類が限られていることや ADCC や CDC の殺傷能力の限界から、これらの医薬品開発の壁が存在していた。

この問題を解決するため、多くの優れた技術が開発されてきた。例えば、抗体薬物複合体(ADC)は、抗体に抗がん剤を付加することにより、抗体による標的細胞の特異性と低分子化合物による強力な殺傷作用を持つ(10, 11)。二重特異性抗体は、異なる抗体結合部位を一つの抗体に組み込むことにより、標的細胞と T 細胞や NK 細胞などのエフェクター細胞を標的化し、これらの細胞を会合させることで、エフェクター細胞による標的細胞の殺傷を誘導する(12-14)。さらに、細胞療法である CAR-T 細胞は、抗体結合部位を組み込んだキメラ抗原受容体(CAR)を遺伝子工学的に T 細胞へ発現させ、CAR により標的化した標的細胞を殺傷する(15-17)。ここで述べられた治療技術は、抗体の標的化能力を利用した治療プラットフォームとなっている。しかしながら、ADC には抗がん剤を付加したことによる毒性が存在し、二重特異性抗体には T 細胞や NK 細胞を標的化することによるサイトカイン放

出症候群や免疫細胞の異常活性化の副作用があげられ(14)、CAR-T 細胞では治療コストが高いことや固形がん環境への浸潤が難しく、開発が成功していないなど(16)、それぞれが得意とする疾患で優れた治療成績を上げながらも依然として問題点が多い。そのため、世界は抗体の標的化能力を利用した新たな治療プラットフォームを求め続けている。

そこで本研究では、抗体の標的化能力を利用した新たな治療プラットフォームの開発を目的として、上記の生体を持つ優れた死細胞除去機構に着目し、標的とする不要細胞を除去するための新規モダリティの開発を目指した。

1-3 死細胞貪食機構

死細胞貪食機構では、貪食細胞が”Eat-me”シグナルである PtdSer を標的として死細胞を貪食により生体内からクリアランスする。この死細胞貪食機構は、ビタミン K 依存性タンパク質であるプロテイン S により制御される。プロテイン S は肝臓で合成されたのち血清中を循環し、死細胞膜表面上に露出する PtdSer に結合する(18)。PtdSer に結合したプロテイン S は、同時に貪食細胞上に発現する受容体型チロシンキナーゼである MerTK や Tyro3 に結合し、二量体化を誘導する(Figure.1-1)。死細胞およびプロテイン S によって二量体化誘導された MerTK/Tyro3 は、自己リン酸化し、細胞内へシグナル伝達、貪食細胞による死細胞貪食を引き起こす(Figure.1-1)(19-21)。

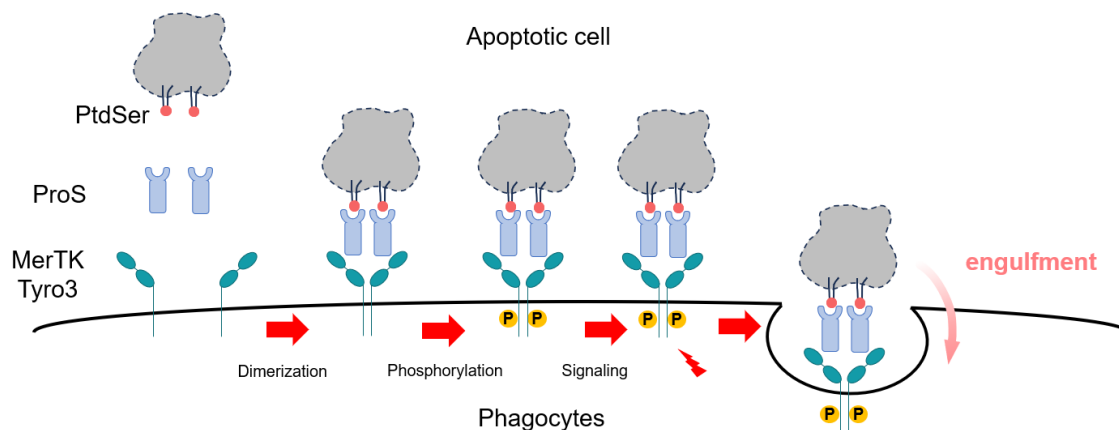


Figure.1-1: 死細胞貪食機構

死細胞貪食機構では、血清タンパク質プロテイン S(ProS)が、死細胞(Apoptotic cell)の細胞膜表面上に露出するホスファチジルセリン(PtdSer)と貪食細胞膜上の貪食レセプターである MerTK/Tyro3 に結合することで MerTK/Tyro3 の二量体化(Dimerization)を誘導する。受容体型チロシンキナーゼである MerTK/Tyro3 は、二量体化が誘導されたのち自己リン酸化し、細胞内へシグナル伝達、標的である死細胞の貪食を引き起こす。

1-4 死細胞貪食機構を介した新規貪食誘導分子の開発

以上で述べたように、我々の生体内には毎日数千億個もの死細胞を除去する非常に優れた死細胞貪食機構が存在する。しかしながら、現在この機構を利用した細胞標的アプローチ

は、キメラ貪食レセプターを発現したマクロファージの移植など(22)、細胞を利用したアプローチに限定されており、CAR-T 細胞と同様の問題点を抱える。そこで本研究では、死細胞貪食誘導分子であるプロテイン S に着目した。前項 1-3 で述べたように、プロテイン S は死細胞の細胞表面上に露出された PtdSer に結合し、また貪食細胞上のレセプターである MerTK や Tyro3 にも結合することで、死細胞と貪食細胞のコネクター分子のように働き、貪食細胞による死細胞貪食を誘導する(Figure.1-2)。見方を変えれば、プロテイン S は、死細胞の標的分子である PtdSer を標的化した貪食誘導分子である。ここで、私は PtdSer に対する標的化を、任意の細胞表面抗原に対する標的化に置き換えることで、任意の不要細胞の貪食誘導を起こす新規貪食誘導分子の開発を考えた。プロテイン S は、そのアミノ酸配列および機能から PtdSer に結合する標的化部位と MerTK/Tyro3 へ貪食シグナルを誘導する貪食機能部位に分割でき、それぞれ標的結合モジュールと ProS モジュールと名付けた。私は、PtdSer に限定されていた標的結合モジュールを、抗体をはじめとした標的結合分子に置き換え、ProS モジュールと結合させた新規貪食誘導分子を Crunch(Connector for Removal of Unwanted Cell Habitat)と名付けた(Figure.1-2)。この Crunch は、抗体などによって不要細胞を標的化し、毎日数千億個の死細胞を処理する死細胞貪食機構を利用して不要細胞を貪食することが期待される。

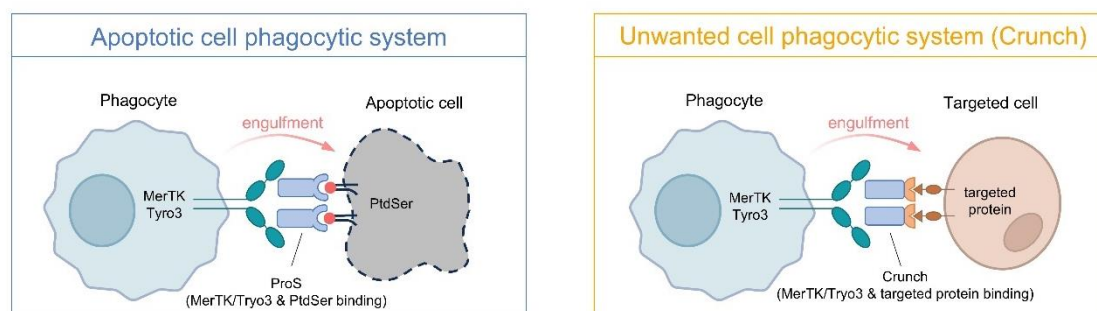


Figure.1-2: 新規貪食誘導分子 Crunch

死細胞貪食機構(Apoptotic cell phagocytic system)は、プロテイン S(ProS)が貪食細胞上の MerTK/Tyro3 および死細胞上のホスファチジルセリン(PtdSer)に結合し、MerTK/Tyro3 にシグナルを伝達することで死細胞貪食を誘導する。すなわち、ProS は PtdSer を標的とした貪食誘導分子と考えられる。不要細胞除去機構(Unwanted cell phagocytic system)では、ProS の PtdSer 結合部位を標的細胞の標的分子結合部位に変更した新規貪食誘導分子(Crunch)により、貪食細胞による標的細胞貪食を誘導する。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

1-5 本研究の目的

本研究では、生体が保有する優れた貪食機構を利用した新規貪食誘導分子 Crunch の開発を行い、任意の不要細胞を除去する新しいモダリティを構築することを目的とする。

第2章 材料と方法

2-1 マウス

C57BL/6 および MRL/Mpj、MRL/Mpj^{lpr/lpr} マウスは日本 SLC 社から購入された。これらのマウスは京都大学物質細胞統合システム拠点(iCeMS)において、12 時間の昼夜周期の環境下で飼育された。全ての動物実験は国際ガイドラインおよび京都大学動物実験に関する指針に従い、京都大学動物実験委員会の承認を受けた上で実施された。

2-2 細胞株と培養方法

Ba/F3 細胞と HEK293T 細胞、NIH3T3 細胞は大阪大学の長田重一教授から分与頂いた。B16F10 細胞と CHO 細胞、SH-SY5Y はそれぞれ、京都大学医生物学研究所の森田大輔助教、京都大学生命科学研究科の見学美根子教授、京都大学農学研究科の木村泰久教授から分与頂いた。Xkr8(2)および TMEM16F(23)が欠損した Ba/F3 細胞 (BDKO) および hXkr4 の活性型 (aXkr4) を発現する Ba/F3 細胞は京都大学物質-細胞統合システム拠点の圓岡真宏特定講師より分与頂いた。Ba/F3 細胞と BDKO 細胞は 10%の fetal bovine serum(FBS, gibco) および 1%の antibiotics(Nacalai)、45 units/ml IL-3(24)、55 μ M の beta 2-mercaptoethanol(2-ME, Nacalai)が添加された RPMI(Wako)培地を用いて培養された。HEK293T 細胞と NIH3T3 細胞は 10%の FBS、1%の antibiotics が添加された D-MEM(Wako)培地を用いて培養された。K562 細胞と B16F10 細胞は 10%の FBS、1%の antibiotics、55 μ M の 2-ME が添加された RPMI 培地で培養された。CHO 細胞と SH-SY5Y 細胞は 10%の FBS、1%の antibiotics が添加された D-MEM/Ham's F-12(Wako)培地で培養された。すべての細胞は 37°C、5%CO₂ のインキュベーターで培養された。

2-3 プラスミドの設計

GFP を細胞表面上に発現させるために、monomeric EGFP の N 末にマウス CD8a (NM_001081110.2)のシグナル配列(SS)、C 末にマウス CD8a の膜貫通領域が結合された (GFPm)。マウス CD8a の配列はマウス脾臓 cDNA から得られた。*Rosa26^{GFPm-OVA}* マウス作製のために、GFPm の C 末に GGGGS リンカー、卵白アルブミン(OVA)(25)が結合された (GFPm-OVA)。OVA の配列は Addgene(#64599)から取得した。シグナル配列のスクリーニングのためのシグナル配列は、マウス Albumin(NM_009654)(26)、マウス EGF(NM_010113.4)(27)、マウス Fibroblast growth factor-9 (FGF-9)(NM_013518.5)(28)、マウス Immunoglobulin G(IgG) (BC092269)、マウス Interleukin-2 (IL-2)(NM_008366.3)(29)が使用され、これらの配列は eurofins によって合成された。マウス MerTK とヒト MerTK は Codon optimization を行い IDT で合成され、C 末に FLAG tag が結合された。Split-GFP アッセイのために、super folder GFP(sfGFP)が使用され、N 末側

(sfGFP1-10)と C 末側(sfGFP11)に分割され、マウス MerTK の C 末側に GGGGS x3 リンカーに続いて結合された。これらの配列は、pNEF、pLenti-IRES-tagRFP、pLenti-IRES-puro、pBlueScript ベクターに挿入し、使用された。

2-4 細胞株の樹立

細胞株樹立のためには、レンチウイルスを用いた感染法が主に使用された。レンチウイルスの精製は Maruoka ら(24)のプロトコルに基づいて実施された。2×10⁶細胞の HEK293T 細胞を 10 cm ディッシュに播種し、24 時間培養後にレンチウイルス構成要素である導入遺伝子をコードした plenti、plenti-IRES-tagRFP、plenti-IRES-puro ベクターと、pCMV-VSVG-RSV-Rev (RIKEN) および pCAG-HIVgp (RIKEN) を Polyethylenimine MAX (PEI, Polysciences) がトランスフェクションされた。トランスフェクションから 48 時間後に、上清を回収およびろ過後、20,000×g、4°C、2 時間で遠心することによりウイルス濃縮が行われた。遠心により得られたレンチウイルスペレットは、新しい培地に懸濁され、以下の細胞への感染に使用された。濃縮されたレンチウイルスは、1×10⁵個の Ba/F3、BDKO および 1×10⁴個の NIH3T3、CHO、B16F10 細胞に対して添加され、6 時間の培養後に上清を新しい培地に変更することで細胞への感染が行われた。感染後、一部のウイルス感染細胞には、感染細胞を選択するため puromycin (InvivoGen, 1–10 µg/mL) を添加し、数日間培養されるか、蛍光を標識としてフローサイトメトリーによりソーティングされた。

GFP を細胞膜表面に発現(GFPm)した BDKO 細胞の作製には、エレクトロポレーション法が用いられた。GFPm遺伝子をコードした pNEF プラスミドは制限酵素 AhdI で切断され、Napa21 (Nepagene) を用いて BDKO 細胞にエレクトロポレーションされた。遺伝子導入細胞を選択するため、ジェネティシン (Gibco, 1 mg/mL) で数日間培養された。

2-5 *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスの樹立

Rosa26^{GFPm-OVA} マウスは、C57BL/6 マウスの *Rosa26* 遺伝子座を標的として GFPm-OVA 遺伝子のノックインにより作製された。具体的には、GFPm-OVA をコードした pBlueScript ベクターを、Cas9 タンパク質および *Rosa26* 遺伝子座を標的とした sgRNA とともに受精卵へ注入し、雌マウスに移植した(Figure.2-1A)。ノックインマウスは、京都大学医生物学研究所の動物施設にて作製された。GFP の細胞表面上発現の確認を目的として、*Rosa26^{GFPm-OVA}* マウス由来の胸腺細胞、脾細胞、骨髄細胞、血液細胞に対するフローサイトメトリーが項目 2-8-2 に示されているように実施され、細胞表面上発現レベルは異なるが、すべての細胞腫で GFP の細胞表面上発現が確認された(Figure.2-1B)。また、*Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスの細胞に対して GFPNb-Crunch が結合するか確認するため、*Rosa26^{GFPm-OVA}* マウス由来の胸腺細胞、脾細胞、骨髄細胞、血液細胞に対するフローサイトメトリーが項目 2-8-3 に示されているように実施され、GFPNb-Crunch がマウス初代細胞膜上の GFP に結合

可能であることが確認された(**Figure.2-1C**)。また、**Figure.2-1B** から胸腺細胞が最も高い GFP 細胞表面発現を示したことから、標的細胞として用いられた。マウスの遺伝子型は以下のプライマーを用いて判別された。

- Forward : 5'-GCTGAGCCAGACCTCCATCGCGCAC-3'
- Reverse WT : 5'-CGGTCCTCAGAAGCCAGGAG-3'
- Reverse KI : 5'-ATGTACTGCCAAGTGGGCAGTTTAC-3'

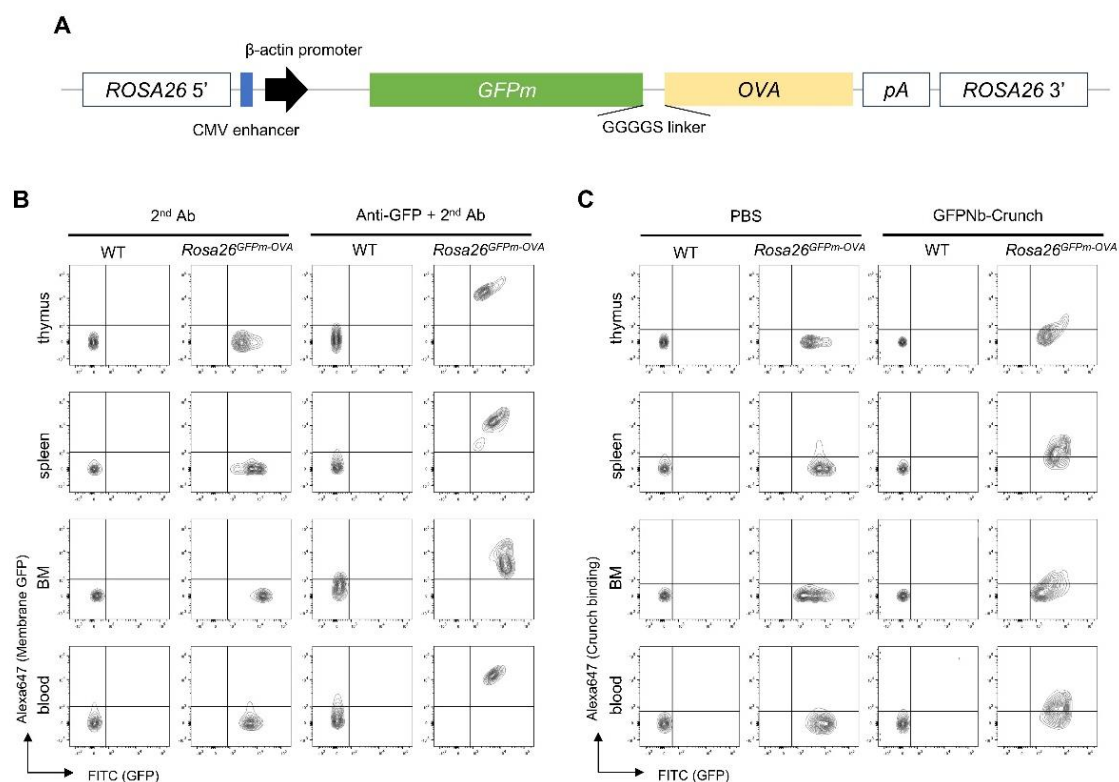


Figure.2-1: *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウス

(A) *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスの概略図。CMV enhancer、チキン β -アクチンプロモーター(β -actin promoter)、GGGGS リンカーで融合した GFPm と卵白アルブミン (OVA)、およびウサギ β -グロブリンのポリアデニル化シグナル (pA) を Rosa26 遺伝子座に挿入し、C57BL/6 系統の *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスが作製された。

(B) *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスにおける GFP の細胞表面上発現。野生型 (WT) および *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウス由来の胸腺細胞、脾細胞、骨髄細胞、および血液細胞に対して anti-GFP antibody 染色を行い、フローサイトメトリーにより細胞表面上の GFP 発現が確認された。

(C) *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウス細胞に対する Crunch の結合。WT または *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウス由来の胸腺細胞、脾細胞、骨髄細胞および血液細胞に対して Crunch 結合アッセイが行われた。細胞は GFPNb-Crunch (10 μ g/ml) 存在下または非存在下でインキュベーションされ、anti-FLAG antibody を用いた解析により GFPNb-Crunch 結合が検出された。

(B)および(C)の横軸は GFP 発現を示し、縦軸は Crunch の結合を示す。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

2-6 Crunch タンパク質の生産

2-6-1 Crunch 高発現細胞株作製

Crunch はシグナル配列 (SS)、標的結合モジュール、プロテイン S の 4 つの上皮成長因子(EGF)様ドメインおよび性ホルモン結合グロブリン(SHBG)様ドメインにより構成され、C 末端に精製用の 8 個の His タグおよび検出用の FLAG タグが付加された(**Figure.3-1-1**)。GFPnb-Crunch は、マウス CD8a シグナル配列が使用され、GFP ナノボディの配列は IDT による合成で取得された。scCD19-Crunch および scGFP-Crunch は、それぞれマウス CD19 に対する scFv(Addgene #107227)(**30**)と GFP に対する scFv (Addgene #182095) (**31**)が使用された。scTYRP1-Crunch は、抗 TYRP1 抗体 (20D7S, KEGG D10124) (**32**)の V_L および V_H 領域を(GGGGS)₃リンカーで連結した scFv が IDT 社により合成され使用された。マウスプロテイン S 配列 (NM_011173.3) はマウス眼球由来 cDNA から増幅され、ヒト ProS 配列 (NM_000313.4) は IDT 社により合成で取得された。Crunch の安定高発現細胞株は、**項目 2-4** で示されたレンチウイルス感染(pLenti-IRES-tagRFP ベクター)による遺伝子導入および tagRFP 高発現細胞のソーティングにより CHO 細胞で樹立された。

GFP nanobody アミノ酸配列
GSDVQLQESGGGSGVQAGGSLRLSCAASGDTFSSYSMAWFRQAPGKECELVSNILRD GTTTYAGSVKGRFTISRDDAKNTVYVLQMVNLKSEDTARYYCAADSGTQLGYVGAV GLSCLDYVMDYWGKGTQVTVSS

2-6-2 培養上清中タンパク質の His タグ精製手法の最適化

細胞培養に用いられる培地には、細胞が自身で合成できないため、必須アミノ酸のヒスチジンが多く含まれている。そのため、培養上清中タンパク質の His タグ精製の効率低下が予測された。実際に、**項目 2-6-1** で得られた Crunch 高発現 CHO 細胞の培養上清に対して Ni-NTA ビーズを用いた His タグ精製を行ったところ、精製効率が低いことが確認された(**Figure.2-2**)。そこで、His タグ精製手法の最適化を試みた。Ni-NTA ビーズは、His タグが付加されたタンパク質の精製に使われる担体で、ヒスチジンとニッケルイオンによるキレート結合により行われる。この結合には pH が影響し、通常 pH8.0 以上で安定した結合が起こることが知られており、His タグ精製に用いられる Buffer は pH8.0 に調整されている。そこで、反応時の pH を変更することで培地中のヒスチジンが外れ、His タグが付加された Crunch が結合する条件の探索を行った。その結果、25 mM HEPES-NaOH(pH7.4)を加えた条件でほぼ 100%の精製効率が確認された(**Figure.2-2**)。この条件を、Crunch の精製条件として使用した。

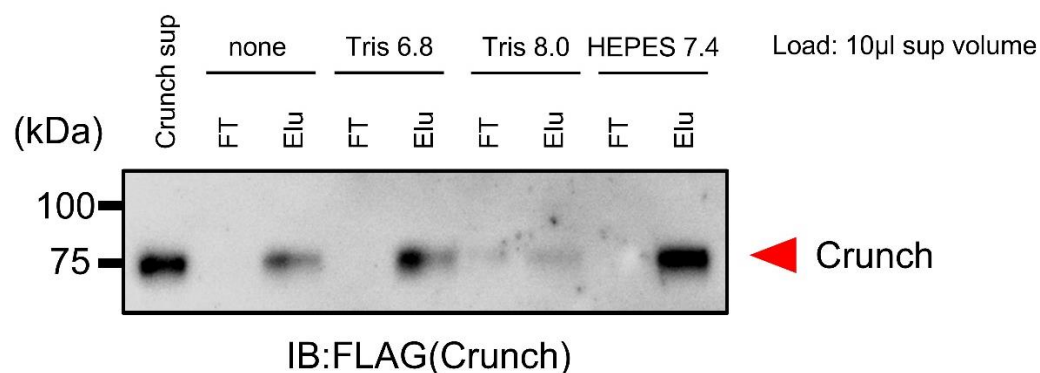


Figure.2-2: His タグを用いた Crunch 精製条件の最適化

Crunch 安定高発現 CHO 細胞が 15 cm 培養ディッシュに 6×10^6 細胞播種し、16 時間後に無血清の DMEM/Ham's F-12 培地（抗生物質含有）に変更され、7 日間培養された。培養後、上清が 0.2 µm フィルターでろ過し回収された。1 mL の上清に最終濃度 25 mM の Tris-HCl pH6.8(Tris 6.8), Tris-HCl pH8.0(Tris 8.0), HEPES-NaOH pH7.4(HEPES 7.4)および Ni-NTA アガロースビーズが加えられ、4°Cで一晩インキュベーションされた。翌日、Flow through サンプル(FT)および溶出サンプル(Elu)が回収された。精製前の上清(Crunch sup)を含めて、Load 量が 10 µL の input sup volume になるように調整され、SDS-PAGE および WB により Crunch が検出された。

2-6-3 Crunch の発現精製

Crunch の精製では、Crunch 安定高発現 CHO 細胞を無血清の DMEM/Ham's F-12 培地（抗生物質含有）で 5～7 日間培養後、上清が 0.2 μ m フィルター（Thermo Fisher Scientific）でろ過し回収された。ろ過後の上清から前項 2-6-2 で樹立した His タグ精製により Crunch タンパク質が精製された。具体的には、最終濃度 25 mM HEPES-NaOH（pH 7.5）と Ni-NTA アガロースビーズ（Fujifilm）をろ過後の上清に加え、4℃で一晩インキュベートされた。翌日、Ni-NTA ビーズから Crunch を溶出し、Amicon Ultra（Merck）を用いて、精製 Crunch タンパク質は DPBS（Nacalai）に溶媒置換及び濃縮された。Crunch タンパク質濃度は SDS-PAGE と CBB 染色により測定され、タンパク質純度は SDS-PAGE および項目 2-8 で記述されたサイズ排除クロマトグラフィーにて確認された（Figure.2-3A-B）。

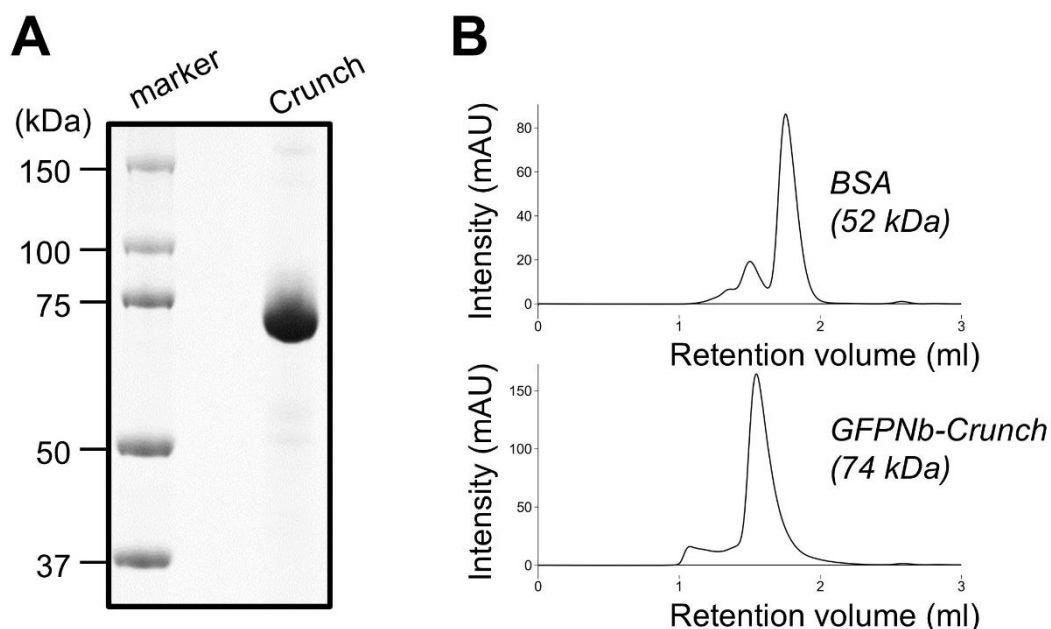


Figure.2-3: Crunch 純度

(A) SDS-PAGE による純度確認。精製された GFPNb-Crunch(Crunch)は SDS-PAGE および CBB 染色によりタンパク質純度が確認された。

(B) サイズ排除クロマトグラフィーによる純度確認。BSA および精製された GFPNb-Crunch はサイズ排除クロマトグラフィーにより解析された。各保持容量による UV の吸光度を示す。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

2-6-4 Crunch シグナル配列スクリーニング

シグナル配列スクリーニングでは、**項目 2-3** で示した異なるシグナル配列を含む Crunch をコードしたプラスミドが HEK293T にトランスフェクションされ、トランスフェクション 48 時間後に培養上清が回収、遠心により細胞デブリを取り除くことでサンプル回収された。回収されたサンプルは、**項目 2-6-3** で示された手法で His タグ精製され、WB および CBB 染色で解析された。

2-7 大腸菌組み換えタンパク質の生産

GFP および GFP ナノボディは、BL21 (DE3, NEB, C2527) 株に pCold プラスミドを形質転換することで発現された。形質転換後の BL21 株は、LB 培地にて 37°C で OD₆₀₀ が 0.4–0.8 になるまで培養され、氷上で冷却された後、0.125 mM IPTG を添加して 15° C で 16 時間培養された。培養後、大腸菌体は 6,000×g、4° C、5 分間遠心し、DPBS で洗浄された。可溶性タンパク質は、TNE バッファー (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) 中で超音波破碎を行うことで抽出された。可溶性画分は 20,000×g、4°C、10 分で遠心されることで不可溶性画分を沈殿させ、上清として取得された。取得された可溶性画分は、**項目 2-6-3** で示された手法で His タグ融合 GFP および GFP ナノボディが精製された。

2-8 HPLC

組換えタンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーにて分析された。Superdex Increase 200 5/150 GL カラム (GE Healthcare) を用い、0.15 mL/min の流速で DPBS がカラムバッファーとして使用された。

2-8 フローサイトメトリー(FACS)

フローサイトメトリー(FACS)のサンプル準備は、サンプルの種別に応じて以下の手順で行われた。準備されたサンプルは、FACS Lyric (BD Biosciences) または FACS Aria (BD Biosciences) で解析された。データは FlowJo (BD Biosciences) で解析された。

2-8-1 抗体を用いた培養細胞解析

抗体染色の前に、細胞は DPBS で洗浄された。MerTK 検出のために、NIH3T3 細胞または MerTK 発現 NIH3T3 細胞は、anti-MerTK-biotin 抗体 (R&D, BAF591, 1 µg/mL) を FACS Buffer (1 mg/mL BSA を含む DPBS) 中で氷上 30 分間インキュベーションされた。染色後、細胞は FACS Buffer で洗浄され、Streptavidin-Alexa647 (Jackson, 016-600-084, 1:1000) を FACS Buffer 中で同様にインキュベーションされた。細胞表面上の GFP 検出のために、

BDKO 細胞または GFPm 発現 BDKO 細胞は、rabbit anti-GFP 抗体 (MBL, 568, 1:1000) を用いて同様に染色された。洗浄後、Alexa-647 標識 Donkey anti-rabbit IgG 抗体 (Invitrogen, A-31573, 1:1000) で同様に染色された。

2-8-2 抗体を用いた生体由来細胞解析

生体由来の細胞解析では、単一細胞の分離処理または赤血球溶解が行われたのち、抗体染色が行われた。脾細胞、骨髓細胞、血液細胞は RBC Lysis Buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) を用いて室温で 1 分間インキュベーションの処理が 3 回繰り返され、赤血球溶解された。また、一次抗体染色時に Fc block (Biosciences, 553142, 1:1000) が添加され、Fc receptor に対する抗体の非特異結合が阻害された。抗体染色は、**項目 2-8-1** と同様の手法で実施された。

2-8-3 Crunch 結合の検出(Crunch 結合アッセイ)

Crunch による標的細胞への結合を検出するため、FACS を用いた Crunch 結合アッセイが行われた。アッセイの Crunch サンプルは、**項目 2-6** で示した精製タンパク質、マウス血漿が用いられた。マウス血漿は、ヘパリンがコートされたヘマトクリットチューブを用いて尾静脈から 20 μ L 程度の血液が回収され、17,000 $\times$ g、25°C、5 分間の遠心で血小板、血球画分を沈殿させ、上清として回収された。アッセイでは、特に指示されない限り Crunch を含む培養上清、10 μ g/mL の精製 Crunch、10 倍希釈したマウス血漿が FACS Buffer 中で 5×10^4 個の標的細胞と氷上 30 分間インキュベーションされた。結合した Crunch の検出には、**項目 2-8-1** と同様に rabbit anti-FLAG 抗体 (MBL, PM020, 1:1000) を反応させ、続いて Alexa-647 標識 Donkey anti-rabbit IgG 抗体 (1:1000) で染色された。

2-9 SDS-PAGE およびウエスタンブロッティング(WB)

細胞溶解液は、RIPA Buffer (50 mM HEPES-NaOH [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム) にプロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai) を加えて調製された。リン酸化タンパク質の検出には上記に加え、ホスファターゼ阻害剤カクテル (PhosSTOP, Roche) が添加された。細胞と混合後、氷上で 15 分間インキュベーションされ、20,000 $\times$ g、4°C、15 分の遠心により不可溶性画分をペレットとして取り除き、上清はサンプルとして回収された。サンプルのタンパク質濃度は BCA プロテインアッセイキット (Thermo Fisher Scientific) で測定された。濃度測定されたサンプルは、RIPA Buffer および 5 倍 SDS Sample Buffer (200 mM Tris-HCl [pH 6.8], 10% SDS, 25% グリセロール, 5% 2-メルカプトエタノール, 0.05% ブロモフェノールブルー) で濃度が調整され、Extra PAGE One プレキャストゲル (5–10% または 10–20%, Nacalai) にて、35 mA で 40 分間電

気泳動された。その後、0.1 A、60 分間で PVDF 膜へ転写され、Blocking Buffer (5% スキムミルクまたは 5% BSA を含む TBS-T) または Can Get Signal PVDF ブロッキング試薬 (TOYOBO) でブロッキングが行われた。ブロッキング後、Blocking Buffer もしくは Can Get Signal に懸濁された一次抗体を用いて 4°C、一晩の反応が行われた。TBS-T で洗浄後、Blocking Buffer もしくは Can Get Signal に懸濁された二次抗体を用いて室温、1 時間の反応が行われた。HRP シグナルは、Immobilon Western 化学発光 HRP 基質 (Millipore) を用いて FUSION 化学発光イメージングシステム (Vilber) で検出された。データは ImageJ を用いて解析・定量された。実験に用いた抗体は以下に記す。

一次抗体

- anti-FLAG-HRP (Sigma, A8592, 1:6000)
- anti-MerTK-biotin (R&D, BAF591, 0.1 µg/ml)
- mouse anti- α -tubulin antibody (Sigma, T6199, 0.5 µg/ml)
- rabbit anti-phospho MerTK antibody (CST, 44463S, 1:1000)

二次抗体

- goat anti-rabbit Ig-HRP antibody (DAKO, P0448, 0.025 µg/ml)
- streptavidin HRP (Proteintech, SA00001-0, 1:20000)
- goat anti-mouse Ig-HRP (DAKO, P0447, 0.1 µg/ml)

2-10 ELISA

結合親和性の確認、Crunch 濃度の定量および**項目 2-18**の抗薬物抗体(ADA)アッセイの ELISA は以下に示す様に行われた。96 well plate の各ウェルに炭酸水素塩緩衝液 (0.15% Na_2CO_3 および 0.293% NaHCO_3 を 100 mL DDW に溶解、pH 9.6) に懸濁された 100 µg/mL のタンパク質を 100 µL 加え、4°C で一晩インキュベーションされた。ウェルを TBS-T で洗浄後、200 µL の ELISA Buffer (2% BSA in TBS-T) で室温 1 時間のブロッキングが行われた。ブロッキング後、再度 TBS-T で洗浄され、サンプルとして ELISA Buffer に懸濁された細胞培養上清もしくは精製 Crunch、マウス血漿 100 µL が加えられた。室温 1 時間のインキュベーション後、anti-FLAG-HRP 抗体 (1:5000) または goat anti-mouse Ig-HRP 抗体 (0.5 µg/mL) を含む ELISA Buffer による室温 1 時間のインキュベーションで結合したサンプルの検出が行われた。HRP シグナルは、TMB 基質 (ナカライ, 05298-80) を添加して発色させ、1 M H_2SO_4 で反応がされた。吸光度は 450 nm で Synergy H1 (BioTek) を用いて測定された。CHO 細胞の培養上清は、**項目 2-6-3**と同様に、無血清培地交換 1 日後から 6 日後までの間に培養上清が回収、遠心により細胞デブリを取り除くことでサンプル回収された。

解離定数 (K_d) は以下の式を用いて R ソフトウェアで算出された：

$$OD/OD_{\max} = X / (Kd + X)$$

(OD：各タンパク質濃度における OD450 値、X：タンパク質濃度)

2-11 微分走査蛍光測定法 (Differential Scanning Fluorimetry: DSF)

タンパク質熱安定性を測定するための DSF は蛍光色素法により実施された(33)。2.5 µg のタンパク質と SYPRO Orange (Invitrogen, S6650, 1:1000) が最終容量 25 µL の DPBS 中で混合された。蛍光シグナルは Thermal Cycler Dice TP700 (Takara) の ROX フィルターを用いて測定された。サンプル 25°C で 10 分間の安定化時間を経た後、温度を 25°C から 95°C まで 1°C/分で上昇された。見かけの融解温度 (T_m) は、蛍光強度の 1 次導関数曲線の最大値から算出された。

2-12 Split-GFP アッセイによる二量体化 MerTK 検出

Split-GFP アッセイに用いる細胞は、項目 2-3 で示した MerTK に superfolder GFP (sfGFP) の N 末側を付加された MerTK-sfGFP1-10 と、sfGFP の C 末側が付加された MerTK-sfGFP11 が NIH3T3 細胞に項目 2-4 の方法で導入され、樹立された(この細胞を MerTK-sfGFP⁺ NIH3T3 細胞と呼ぶ)。最初に、この系が目的とした二量体化 MerTK の検出が可能か検証するため、アポトーシス細胞およびプロテイン S を用いて確認実験が行われた。実験を行う前日に、1×10⁵細胞の MerTK-sfGFP⁺ NIH3T3 細胞が 12 ウェルプレートに播種され、一晩培養された。翌日、DPBS による洗浄後、無処理もしくはアポトーシス誘導された胸腺細胞 (各 1×10⁶個) が標的細胞として、10% FBS(プロテイン S を含む)入りの DMEM と共に加えられた。アポトーシスは、FasL 処理により誘導された(2)。共培養 2 時間後、標的細胞は DPBS で 3 回洗浄して除去され、MerTK-sfGFP⁺ NIH3T3 細胞は FACS Aria および FlowJo で解析された。Crunch を用いた実験では、標的細胞を GFPm 発現 BDKO 細胞または BDKO 細胞、加える培地を GFPNb-Crunch をコードしたプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションした培養上清と変更することで行われた。

2-13 リン酸化アッセイ

標的細胞による貪食細胞のリン酸化の検出のために、MerTK 発現 NIH3T3 細胞が用いられた。はじめに、検出系を樹立するため、アポトーシス細胞およびプロテイン S による MerTK リン酸化誘導の確認実験から行われた。実験前日に、1×10⁵細胞の NIH3T3 細胞または MerTK 発現 NIH3T3 細胞が 12 ウェルプレートに播種され、播種後 6 時間後に培地が無血清 DMEM に交換された。翌日、標的細胞 (1×10⁶個) とプロテイン S が加えられ、300 ×g、37°C、2 分間遠心して細胞同士が接触させられた。15 分間の共培養後、標的細胞を

HEPES Buffer (20 mM HEPES-NaOH [pH 7.4], 137 mM NaCl) で 3 回洗浄し除去され、**項目 2-9** で示した通りホスファターゼ阻害剤が加えられた RIPA Buffer を添加後、氷上で 15 分間静置、その後 1.5 mL チューブに移され、さらに 60 分間氷上でインキュベーションされた。その後、WB に用いられた。標的細胞は**項目 2-12** と同様に無処理もしくはアポトーシス細胞誘導された胸腺細胞が用いられた。プロテイン S は、標的細胞を 10% FBS 含有 DMEM で処理し、FBS 中の遊離 ProS を除去するため無血清 DMEM で洗浄することで標的細胞に結合させ、準備された。その結果、アポトーシス細胞条件でリン酸化 MerTK レベルの上昇が確認され、検出系が動いていることが示された(**Figure.2-4A**)。次に、培養生細胞系で検出系が動くか確認するため、PtdSer を常時露出するスクランブラーゼ hXkr4 の活性型(aXkr4)を発現する aXkr4⁺ Ba/F3 細胞を標的細胞として上記の実験を行うと、aXkr4⁺ Ba/F3 細胞でリン酸化 MerTK レベルの上昇が確認され、検出系が培養生細胞系でも問題なく動くことが確認された(**Figure.2-4B**)。Crunch を用いた実験では、標的細胞と Crunch (0 または 5 µg/mL) を含む 5 mg/mL BSA 入り無血清 DMEM を直接 MerTK 発現 NIH3T3 細胞に加える変更が行われることにより実施された。リン酸化誘導の時間依存性の確認では、標的細胞である GFPm 発現 BDKO 細胞(1×10⁶個)と GFPNb-Crunch(0 または 1 µg/mL) を BSA 添加無血清入り DMEM を MerTK 発現 NIH3T3 細胞に添加し、0~30 分共培養後に洗浄して標的細胞を除去し、MerTK 発現 NIH3T3 細胞を溶解することで行われた。抗 GFP 抗体阻害実験では、共培養時に polyclonal rabbit anti-GFP antibody (MBL, 568, 1:1000)を添加することで実施された。

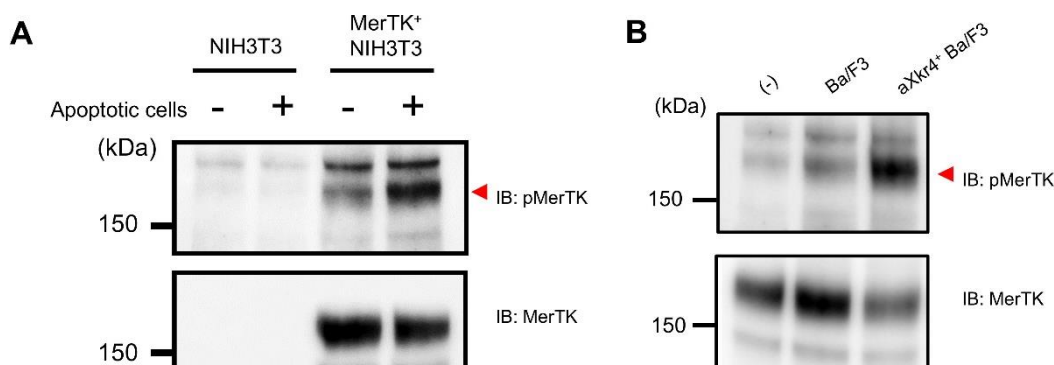


Figure.2-4: MerTK リン酸化検出系の樹立

(A) アポトーシス誘導胸腺細胞およびプロテイン S による MerTK リン酸化。標的細胞はマウス胸腺細胞が用いられ、PBS (-) または Fas リガンド (+) で処理された。これらの胸腺細胞はプロテイン S 結合処理がされ、NIH3T3 細胞もしくは MerTK 発現 NIH3T3 細胞に添加された。遠心処理および 15 分間の共培養後に標的細胞は除かれ、NIH3T3 細胞および MerTK 発現 NIH3T3 細胞の細胞溶解液は WB により解析された。WB では抗リン酸化 MerTK 抗体(pMerTK)および抗 MerTK 抗体(MerTK)が用いられた。

(B) PtdSer を露出する生細胞およびプロテイン S による MerTK のリン酸化。細胞添加なし(-)、Ba/F3 細胞添加(Ba/F3)、aXkr4 発現 Ba/F3 細胞添加(aXkr4⁺ Ba/F3)を用いて(A)と同様に行われた。

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

2-14 細胞生存アッセイ

MerTK 下流シグナルの検出を目的とした細胞生存アッセイでは、IL-3 依存性の Ba/F3 細胞が用いられ、以下のプロトコルで実施された(**Figure.2-5A**)。アッセイ前日に、Ba/F3 細胞は 1×10^6 cells/mL の濃度で IL-3 入り RPMI1640 培地に播種された。翌日、細胞は DPBS で洗浄され、IL-3 を含まない RPMI1640 に、 2.5×10^5 cells/500 μ L の濃度で 12 ウェルプレートへ播種された。細胞生存数は、毎日トリパンブルー染色を用いて細胞を計測されることで評価された。この細胞生存アッセイにより MerTK 下流シグナル検出が可能か検証するため、Ba/F3 細胞に MerTK および aXkr4 を発現させ、アッセイが行われた。その結果、Ba/F3 細胞はプロテイン S 存在下でも生存率が低下し、Ba/F3 細胞の IL-3 依存性が確認された(**Figure.2-5B-E**)。また、MerTK や aXk4 の単独発現 Ba/F3 細胞では生存率改善は見られなかった。一方で、MerTK と aXkr4 の両方を発現する Ba/F3 細胞では生存率の向上が確認された。これは、aXkr4 により PtdSer が露出され、PtdSer-プロテイン S-MerTK の下流シグナルにより Ba/F3 細胞の細胞生存を促進したことを示し、アッセイが機能していることが確認された。これを支持するように、MerTK 単独発現 Ba/F3 細胞でもアッセイ開始 72 時間後に同様な傾向が見られ、死細胞由来の PtdSer により MerTK 下流シグナルが活性化したことが確認された(**Figure.2-5B-E**)。Crunch を用いた実験では、MerTK および GFPm を発現させ、RPMI1640 培地に Crunch (0 または 10 μ g/mL) を添加することで実施された。

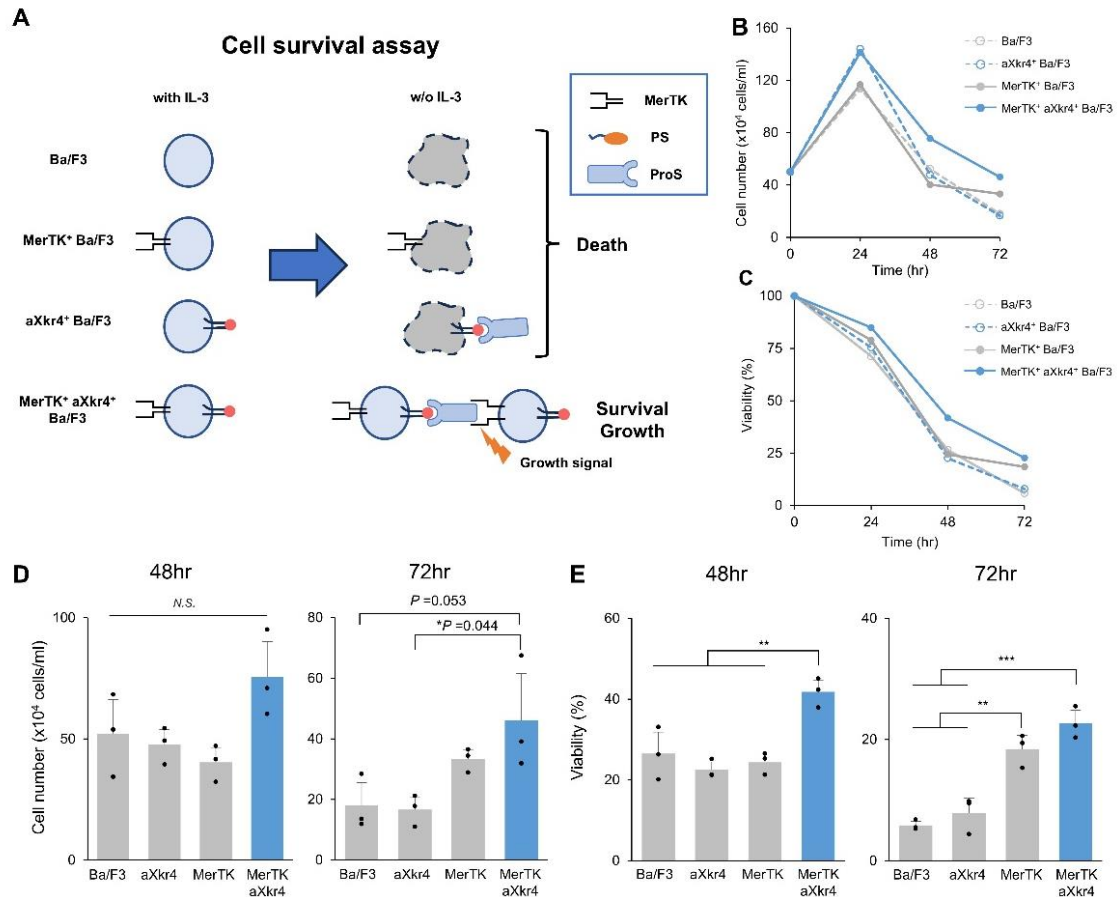


Figure.2-5: 細胞生存アッセイの樹立

(A) 細胞生存アッセイの概略図。以下の4種類のBa/F3細胞を用いた：①野生型、②MerTK発現細胞、③ホスファチジルセリン (PtdSer) を露出するaXkr4発現細胞、④MerTKおよびaXkr4を共発現する細胞 (PtdSer 露出)。各細胞 (2.5×10^5 個) を、FBSを含むIL-3非存在下のRPMI1640培地 (500 μ L) で培養した。PtdSer-ProS-MerTKシグナルが活性化された細胞は、生存および増殖が可能となる。

(B-E) PtdSerおよびMerTKによる細胞生存。細胞数および生存率は、トリパンブルー染色法により24時間ごとに測定された。グラフは細胞数の平均 (B) および生存率の平均 (C) を示す。棒グラフは、48時間および72時間後の細胞数 (D) および生存率 (E) (平均 $\pm$ SD, $n = 3$) を示す。Student unpaired t test (D, E). N.S. $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

2-15 貪食アッセイ

Crunch の貪食誘導効果の評価を目的として、貪食アッセイが行われた。実験前日に、 1×10^5 細胞の NIH3T3 細胞または MerTK 発現 NIH3T3 細胞が 12 ウェルプレートに播種し、一晚培養された。翌日、DPBS により洗浄され、上清を取り除くことで貪食細胞として使用された。標的細胞は、6~10 週齢の *Rosa26^{GFPm-OVA}* 雌マウスから採取した胸腺細胞または、同週齢の C57BL/6 雌マウスから採取した脾細胞（各 1×10^6 個）が、 $0.1 \mu\text{g/mL}$ pHrodo Red（Thermo Fisher Scientific）で室温 30 分間標識され、用いられた。0~10%FBS および Crunch（0 または $10 \mu\text{g/mL}$ ）の条件で、DMEM 中で標的細胞と貪食細胞が共培養された。共培養開始 3 時間後、標的細胞は DPBS で 3 回洗浄して除去され、貪食細胞は CHES バッファー（20 mM CHES [pH 9.0], 150 mM NaCl, 2% FBS）に懸濁され FACS Aria および FlowJo で解析された。

貪食細胞としてマクロファージを用いるアッセイでは、以下の手順でマクロファージが用意された。8~10 週齢の C57BL/6 雌マウスに 3%チオグリコール酸（2 mL）が腹腔内投与され、投与 3 日後に腹腔内細胞が 10 mL DPBS で回収された。 1×10^5 細胞の腹腔細胞が 12 ウェルプレートに播種され、10% FBS および抗生物質を含む DMEM で 3 時間培養された。培養後、DPBS で 3 回洗浄し、接着細胞をマクロファージとし、貪食細胞としてアッセイに用いられた。また、標的細胞との共培養後、標的細胞は DPBS で 3 回洗浄して除去され、マクロファージは Accutase（ICT, AT104）でディッシュから剥離された。剥離されたマクロファージは、抗 CD11b-APC 抗体（1:200）を用いて CHES バッファー、氷上 30 分間で染色された。染色後、マクロファージは DPBS で洗浄され、CHES バッファーに DAPI（1:2000）を加えて懸濁され、FACS Aria で解析された。

2-16 脾細胞移植

Crunch の生体内作用の評価を目的として、脾細胞移植実験が行われた（Figure.3-3-1A）。標的細胞である GFPm 発現脾細胞は、6~10 週齢の *Rosa26^{GFPm-OVA}* 雄マウスから採取された。 1×10^7 細胞の GFPm 発現脾細胞は、6~10 週齢の C57BL/6 雄マウスに静脈内移植された。脾細胞移植 1 日後に、DPBS または GFPNb-Crunch（ $100 \mu\text{g}$ ）が腹腔内投与された。脾細胞移植 4 日後、マウスから脾細胞および血液細胞が回収され、解析に用いられた。血液細胞は、RBC Lysis Buffer（155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA）で 3 回洗浄され、赤血球が除かれ、用いられた。これらの細胞は FACS Lyric および FlowJo により解析された。

2-17 生体内貪食アッセイ

Crunch の生体内貪食誘導の評価を目的として、生体内貪食アッセイが行われた

(Figure.3-3-1G)。標的細胞である GFPm 発現脾細胞は、6~10 週齢の *Rosa26^{GFPm-OVA}* 雄マウスから採取され、 1×10^7 細胞の GFPm 発現脾細胞が、0.1 $\mu\text{g/mL}$ の pHrodo Red で室温 30 分間標識された。標識された標的細胞は 6~10 週齢の C57BL/6 雄マウスに静脈内投与された。脾細胞投与 2 時間後に、DPBS または GFPNb-Crunch(100 μg) が腹腔内投与された。脾細胞投与 24 時間後、マウスから脾細胞が回収され、解析に用いられた。回収された脾細胞は、抗 MerTK 抗体または抗 F4/80 抗体で染色され、解析された。抗 MerTK 抗体染色では、anti-MerTK-biotin antibody (1 $\mu\text{g/mL}$) で染色され、Streptavidin-Alexa647 (1:1000) で二次染色された。また、抗 F4/80 抗体染色では、Fc block (Biosciences, 553142, 1:1000) で氷上 5 分の前処理がされたのち、anti-mouse F4/80-APC/Cy7 antibody (Biolegend, 157315, 1:200) で氷上 30 分間染色された。染色された細胞は、染色後に CHES バッファ (DAPI 含有) に懸濁され、FACS Aria および FlowJo で解析された。

2-18 生体内半減期および抗薬物抗体(ADA)アッセイ

Crunch の薬物動態解析のため、生体内半減期実験および ADA アッセイが行われた。これらの実験では、8~10 週齢の C57BL/6 雌マウスを用いて実施された。生体内半減期実験では、マウスに 150 μg のタンパク質が静脈内投与もしくは腹腔内投与され、尾静脈採血(ヘパリンコート毛細管を利用)が行われた。ADA アッセイでは静脈内投与により行われた。生体内半減期実験では、投与後 10 分、1 時間、4 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間、120 時間に採血が行われた。ADA アッセイでは、投与後 24 日目に採血が行われた。採血された血液は、17,000G、4°C、5 分間の遠心が行われ、遠心後に血漿が回収された。回収された血漿は、生体内半減期実験では 1:10、ADA アッセイでは 1:200 に希釈(50%グリセロール/PBS)され、測定まで-80°Cで保管された。

生体内半減期実験では、回収および希釈された血漿および標準 Crunch タンパク質を用いて、**項目 2-10** に示した GFP に対する ELISA を行うことで血漿中 Crunch 濃度が測定された。半減期は、12 時間から 72 時間のデータを用いて、以下の計算式により計算された(34)。

$$t_{1/2} = t * \log(0.5) / \log(Ac/A_0)$$

($t_{1/2}$: 半減期、 t : 経過時間、 Ac : 残存 Crunch 量、 A_0 : 12 時間時点の Crunch 量)

ADA アッセイでは、回収および希釈された血漿を用いて、**項目 2-10** に示した ELISA を行うことで血漿中 ADA が測定された。また、ADA アッセイのコントロールには、mouse anti-GFP IgG2a antibody (Invitrogen, A-11120) および mouse anti-FLAG IgG1 antibody (Sigma, F1804) が用いられた (各 100 ng/mL)。

2-19 免疫原性予測

B 細胞エピトープの予測には、BepiPred-2.0 (35)が使用され、threshold は 0.5 とした。T 細胞エピトープの予測には、NetMHC4.1(36) が用いられ H-2-kb に対する 8-mer ペプチドで評価し、強いエピトープ (rank ≤ 0.5) と弱いエピトープ (rank ≤ 2.0) の基準で分類された。

2-20 マクロファージ刺激アッセイ

Crunch によるマクロファージ免疫応答評価には、マクロファージ刺激アッセイが行われた。マクロファージは項目 2-15 で示された手法で回収された。回収された 1×10^6 個の腹腔細胞が 12 ウェルプレートに播種され、10% FBS および抗生物質含有 DMEM で 3 時間培養された。洗浄後の接着細胞がマクロファージとして使用された。マクロファージの純度は以下の抗体による FACS 解析で確認された(Figure.2-6) (>95%の純度)：

- 抗 CD45-PE (Biolegend, 147711, 1:200)
- 抗 CD11b-APC (Biolegend, 101211, 1:200)
- 抗 Ly6G-APC/Cy7 (Biolegend, 127623, 1:200)
- 抗 Ly6C-PerCP/Cy5.5 (Biolegend, 128011, 1:200)

マクロファージの刺激では、10 µg/mL Crunch またはマウス IgG2a 抗体(BioXCell, BE0122)、10% FBS、または 10 ng/mL Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma, L4516) が無血清 DMEM に添加され使用された。刺激開始 24 時間後、マクロファージは DPBS で洗浄され、RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN) で抽出された。その後、500 ng の RNA が High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen) で cDNA に変換された。得られた cDNA (10 ng/µL)を用いて、以下の特異的プライマーセットおよび TB Green Premix Ex Taq(Takara)により、Thermal Cycler Dice TP700 (Takara) で遺伝子発現が測定された。

Primerset for RT-qPCR	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>mGAPDH</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA
<i>mIFNγ</i>	ACAGCAAGGCGAAAAAGGATG	TGGTGGACCACTCGGATGA
<i>mIL-6</i>	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
<i>mCCL5</i>	TTTGCCTACCTCTCCCTCG	CGACTGCAAGATTGGAGCACT
<i>mIL-10</i>	CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	GCAGCTCTAGGAGCATGTGG
<i>mArg1</i>	TTGGGTGGATGCTCACACTG	GTACACGATGTCTTTGGCAGA

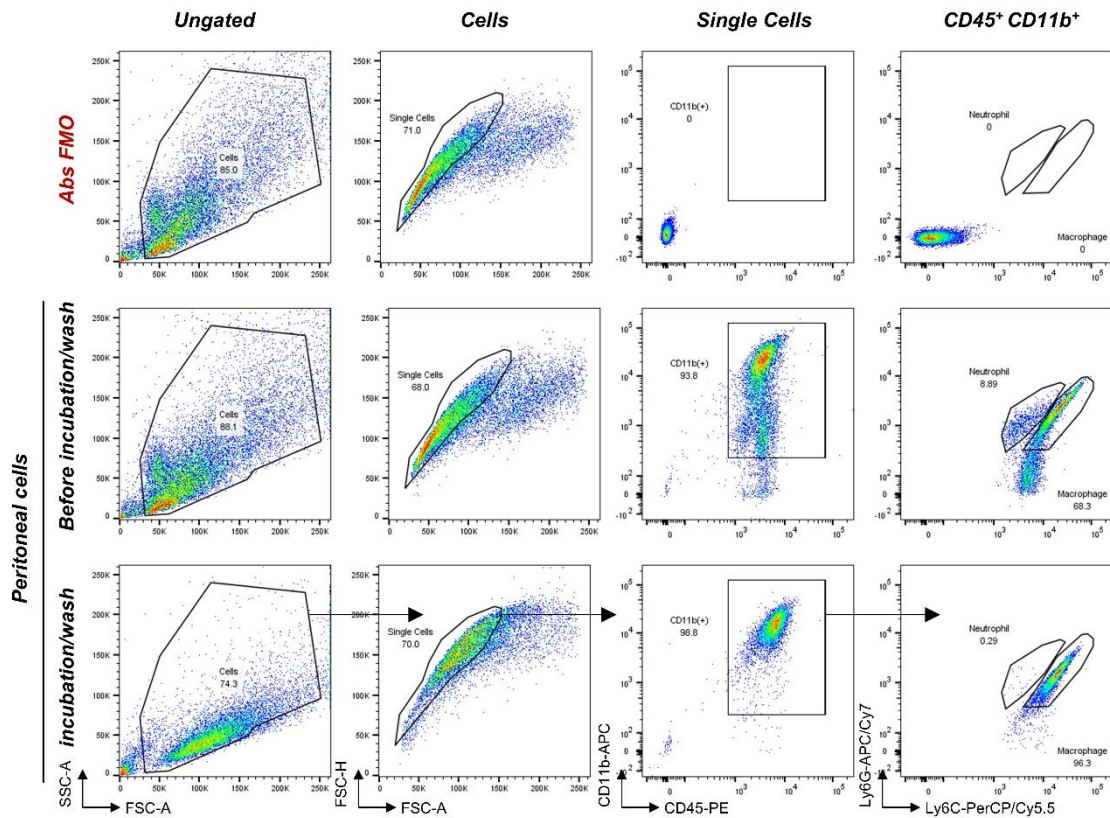


Figure.2-6: マクロファージ純度確認

回収された 1×10^6 個の腹腔細胞が 12 ウェルプレートに播種され、10% FBS および抗生物質含有 DMEM で 3 時間培養された。培養後、DPBS により洗浄され、FACS により解析された (incubation/wash サンプル)。回収された腹腔細胞サンプルも同時に解析、比較された (Before incubation/wash サンプル)。細胞は、FSC-A/SSC-A により gating され、FSC-A/FSC-H により単細胞が gating された。CD45-PE/CD11b-APC により CD11b 陽性 CD45 陽性細胞が gating され、Ly6C-PerCP-Cy5.5/Ly6G-APC-Cy7 により Neutrophil と Macrophage が特定された。項目 2-20 の手法により高純度マクロファージが準備された。

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

2-21 腫瘍移植マウスモデル

Crunch の腫瘍治療効果の評価モデルとして、腫瘍移植マウスモデルが用いられた。実験のタイムコースは [Figure.3-3-2-1A](#) で示しているように行われた。実験に用いられる B16F10 細胞は、実験の 2 日前に 1×10^6 細胞が 10 cm 培養ディッシュに播種され、対数増殖期の細胞が実験に用いられた。腫瘍移植実験は、 5×10^5 細胞の B16F10、GFP 発現 B16F10、または GFPm 発現 B16F10 細胞を、6~8 週齢の C57BL/6 雌マウスの後肢に皮下接種することにより行われた。腫瘍移植 7 日後に、腫瘍が 4 mm^3 に達したマウスが実験に用いられ、移植 7 日後、9 日後、11 日後に生理食塩水または GFPNb-Crunch、scGFP-Crunch、scTYRP1-Crunch が $100 \text{ }\mu\text{g}$ 腹腔内投与された。腫瘍体積はノギスを用いて 3 日ごとに測定され、以下の計算式で求められた。

$$V = \pi \times L \times W^2 / 6$$

(V : 体積、L : 長径、W : 短径)

移植 16 日後にマウスが安楽死されることにより実験は終了され、原発腫瘍が摘出された。実験終了時のマウス重量と原発腫瘍重量が測定された。また、生存期間の治療効果評価では、マウスの死亡が観察された時点を実験終了点とした。

2-22 腫瘍転移モデル

Crunch のメラノーマ肺転移治療効果を評価するため、腫瘍転移モデルが用いられた。腫瘍転移実験は、 1×10^5 細胞の GFPm 発現 B16F10 細胞を、6~8 週齢の C57BL/6 雌マウスに静脈内移植することにより行われた。腫瘍移植 1 日後、3 日後、5 日後に生理食塩水または GFPNb-Crunch が $100 \text{ }\mu\text{g}$ 腹腔内投与された。腫瘍移植 14 日後にマウスが安楽死されることにより実験は終了され、肺が摘出された。転移の定量は、肺に形成された転移結節の数を測定することにより行われた。

2-23 ヒトメラノーマ腫瘍微小環境における免疫細胞解析

メラノーマ治療における Crunch のエフェクター細胞を同定するために、8 名の患者由来のヒトメラノーマデータセットが GEO データベース (アクセッション番号: [GSE115978](#)) ([37](#)) より取得された。これらのデータは Single Cell Portal([38](#))にて細胞種にアノテーションされ、各細胞における MerTK の発現を可視化された。

2-24 B16F10 移植モデルにおける MerTK 発現細胞解析

B16F10 移植モデルにおける Crunch のエフェクター細胞を同定するために、MerTK 発

現細胞解析が行われた。B16F10 細胞を皮下接種 9 日後、マウスから原発腫瘍が摘出された。腫瘍は 1 mg/mL のコラゲナーゼ I (Sigma, C0130) および 10 Kunitz/mL の DNase I (Sigma, D4263) を含む DPBS で 37°C、1 時間処理された。処理後、70 μ m フィルターで濾過され、得られた細胞は FACS 解析で確認された。細胞は、最初に Fc ブロック (1:1000) で 15 分間処理され、続いて氷上 30 分間、DPBS (1 mg/mL BSA 含有) 中で抗 MerTK-ビオチン抗体 (1 μ g/mL) で染色された。染色後、Streptavidin-Alexa488 (1:1000)、抗 CD45-PE (1:200)、抗 CD11b-APC (1:200)、抗 Ly6C-PerCP/Cy5.5 (1:200)、および抗 Ly6G-APC/Cy7 または抗 F4/80-APC/Cy7 抗体 (いずれも 1:200) で染色された。細胞は、DAPI (1:2000) を含む PBS に懸濁され、FACS Lyric で解析された。

2-25 タンパク質構造予測

Crunch および scFv の構造予測には、Crunch 配列の FASTA ファイルを用いて、AlphaFold v2.3.2(39)で解析された。得られた構造は PyMOL ソフトウェアを用いて可視化および解析が行われた。

2-26 B 細胞除去モデル

scCD19-Crunch の生体内 B 細胞除去の評価を目的として、B 細胞除去モデルを用いた。PBS、scGFP-Crunch、scCD19-Crunch、または各種抗体が、6~11 週齢の C57BL/6 雄マウスに腹腔内または静脈内に投与された。抗体投与では、ラット抗マウス CD19 IgG2a 抗体 (1D3, BioXCell, BE0150) およびマウス抗ラット κ 鎖 IgG2a 抗体 (MAR18.5, BioXCell, BE0122) が使用された。抗ラット抗体投与実験では、投与 24 時間前に 1D3 抗体が投与された。また、scCD19-Crunch の 3 回投与実験では、12 時間おきに投与され、3 回目の投与は Day 1 のサンプル採取後に実施された。細胞解析のための FACS は脾細胞および血液が回収され**項目 2-8-2**に示したように行われた。抗体染色は以下のように行われた。Fc ブロック (1:1000) で 15 分間処理後、以下の抗体で氷上 30 分間染色された。

- 抗 CD45-PE (Biolegend, 147711, 1:200)
- 抗 CD19-APC (Biolegend, 115511, 1:200)
- 抗 B220-PE/Cy7 (Biolegend, 103221, 1:200)

2-27 アデノ随伴ウイルス 9(AAV9)

Crunch の生体内持続発現のため、AAV9 が用いられた(40)。AAV ベクターは、ITR 間の配列の長さに制限があるため、Crunch 遺伝子挿入を目的としてベクターの改変、pAAV-EF1 ベクターの作製が行われた(**Figure.2-7A**)。pAAV-EF1 ベクターは、pAAV-U6-sgRNA-CBh-mCherry (Addgene #91947) から NotI で ITR 間配列を切り出し、plenti-Cas9 (Addgene

#52962) から EF1 α プロモーター領域を Infusion 法で挿入することにより作製された。これにより、ITR 間のサイズが 1444 bp まで縮小され、2500~3000 bp までの挿入が可能となった。AAV9 ウイルスの作製は、次のように行われた。pAAV-EF1-tagRFP または pAAV-EF1-scCD19-Crunch、pAdDeltaF6 (Addgene, 112867)、pAAV2/9n (Addgene, 112865) プラスミドが PEI を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションされた。24 時間後、培地が 2 mM L-グルタミンおよび 1 mM ピルビン酸ナトリウム含有の無血清 DMEM に交換され、72 時間後に AAV を含む培養上清および細胞が回収された。

AAV ウイルスの精製は次のように行われた。回収された培養上清および細胞に、最終濃度 10% のクロロホルムが添加され、4°C で 5 分間回転により混合された。次に最終濃度 1.2 M の NaCl が添加され、2,000 $\times$ g で 4°C、10 分間遠心され、上清が回収された。回収された上清に最終濃度 20% の PEG8000 が添加され、4°C で一晩回転により混合された。翌日、2,000 $\times$ g で 4°C、30 分間遠心され、AAV ウイルスがペレットとして沈殿され、上清が取り除いたのちペレットは HEPES バッファー (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 137 mM NaCl) で懸濁された。サンプルは DNaseI および RNaseA で処理され、クロロホルムの添加によるタンパク質除去が行われた。また、Amicon Ultra を用いて DPBS に置換、濃縮された。

AAV ウイルスの力価は、WPRES 配列に対する RT-qPCR により算出された。

- Forward : 5'-GTCCTTTCCATGGCTGCTC-3'
- Reverse : 5'-CCGAAGGGACGTAGCAGA-3'

AAV ウイルスの感染確認は、SH-SY5Y 細胞を用いて行われた。1 $\times$ 10⁸~10¹⁰ vg の AAV9-EF1-tagRFP で作製された AAV9 ウイルスが、前日に播種した SH-SY5Y 細胞 (1 $\times$ 10⁵個) に添加され、感染開始 5 日後に tagRFP 陽性率が FACS により解析され、感染確認が行われた(**Figure.2-7B,C**)。AAV ウイルスのマウス感染は、8~10 週齢の C57BL/6 雄マウスに AAV9-EF1-tagRFP または scCD19-Crunch で作製された AAV9 ウイルス (1 $\times$ 10¹¹ vg) を静脈内投与されることにより行われた。感染確認を目的とした肝細胞解析では、肝臓を DPBS で洗浄後、Trypsin/EDTA 処理 (30 分, 37°C) を行い、70 μ m フィルターで濾過することにより肝細胞が単離され、FACS により解析された。血中 B 細胞は**項目 2-26**と同様に解析された。

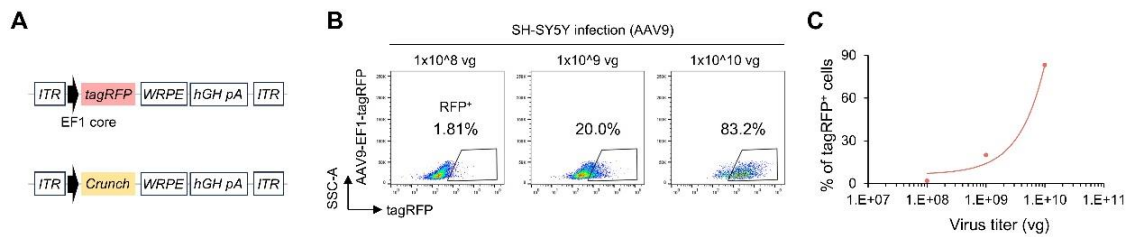


Figure.2-7: AAV9 ウィルス

(A) AAV ベクターの概略図。AAV ベクターの ITR 間に、EF1 core promoter、遺伝子、WPPE、ヒト成長ホルモン pA 付加配列(hGH pA)が挿入された。
(B-C) AAV9 ウィルスの細胞感染。AAV-EF1-tagRFP をコードする AAV ベクターにより作製された AAV9 ウィルス(1×10^8 - 10 vg)が SH-SY5Y 細胞に感染された。FACS のプロット図(B)と tagRFP 陽性率とウィルス力価の関係(C)を示す。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

2-28 全身性エリテマトーデス(SLE)モデル

scCD19-Crunch の治療評価を目的として、SLE モデルが用いられた。8 週齢の MRL^{lpr/lpr} マウスに対して、scGFP-Crunch、scCD19-Crunch または生理食塩水（各 150 μ g）が週 2 回、腹腔内投与された。投与開始 5 週間後、13 週齢に試験を終了し、試験終了時に体重が測定され、脾細胞および末梢血細胞が回収された。これらの細胞は**項目 2-26**と同様に解析された。また、腎臓は**項目 2-29**、尿は**項目 2-30**、血清は**項目 2-31**のように解析された。

2-29 腎臓組織学解析および免疫複合体沈着

SLE モデルの腎臓解析は次のように行われた。MRL(コントロール)または**項目 2-28**で各治療が行われた MRL^{lpr/lpr}マウスの腎臓が摘出され、10%緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋された。腎臓切片(4 μ m)はヘマトキシリン・エオジン染色(H&E)、または DAPI (1:1000) および抗マウス IgG-Alexa647 (Invitrogen, A31571, 1:1000)で染色された。糸球体病変の病理スコアは 0~3 の範囲で半定量評価され、各マウス 5~6 個の糸球体の平均値で算出された(41)。染色切片は共焦点顕微鏡および Fiji で解析された。

2-30 尿中蛋白／クレアチニン比 (UPC)

腎機能の評価として、マウスの尿は QuantiChrom Protein Creatinine Ratio Assay Kit (BioAssay Systems, DPCR-100) を用いて UPC 比が測定された。

2-31 抗核抗体 (ANA) および抗 dsDNA 抗体

SLE の所見である血清 ANA および抗 dsDNA 抗体は次のように評価された。試験終了時に心臓より血清が採取され、血清中の ANA は Mouse ANA ELISA kit (FineTest, EM1607-

CM) で測定された。抗 dsDNA 抗体の評価は、1 μ g のプラスミド DNA が DNA High-Binding Plate (Cell Biolabs, AKR-5182) DNA コーティング溶液で固定され、1:100 に希釈した血清を用いて、**項目 2-10** で示した ELISA を行うことにより行われた。

2-32 統計解析

データは特に指示がない限り平均 $\pm$ 標準偏差 (SD) として示された。2 群間の比較には Student unpaired *t* test を、3 群以上の比較には一元配置分散分析 (ANOVA) および Tukey-Kramer *t* test を使用した。生存率の比較には Kaplan-Meier 法および Log-rank test を用いた。すべての P 値は両側検定で計算し、 $P < 0.05$ を有意とした。

第3章 結果

3-1 Crunch の設計および調製

3-1-1 貪食細胞と不要細胞を橋渡しするプロテイン S の改変

序章で述べたように、エフェロサイトーシスを模倣した、新規モダリティ Crunch を用いた貪食細胞による不要細胞除去システムを提唱し、その Proof of Concept を行った。はじめに、モデル標的分子として GFP、標的細胞として細胞表面に GFP を発現した細胞を選択し、GFP 標的 Crunch として GFP ナノボディ(42, 43)を用いた GFPNb-Crunch を設計した (Figure.3-1-1)。

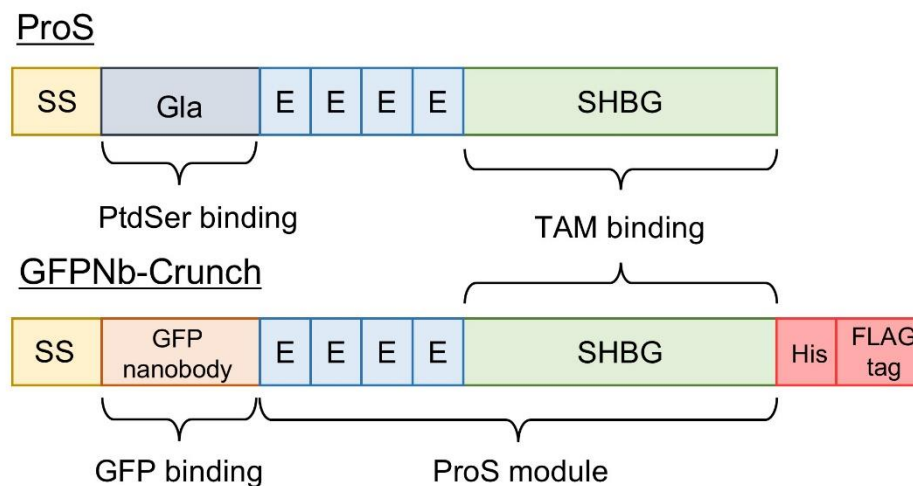


Figure.3-1-1: Crunch の設計

図は、プロテイン S(ProS)および GFPNb-Crunch の概略図を示す。上段は、プロテイン S のシグナル配列 (SS)、 γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメイン、EGF 様ドメイン(E)、および SHBG 様ドメイン(SHBG)を示す。下段は、GFP 標的型 Crunch (GFPNb-Crunch) の SS、GFP ナノボディ、EGF 様ドメイン、SHBG 様ドメイン、8×ヒスチジン (His) タグおよび FLAG タグを示す。Gla ドメインは PtdSer に結合する領域、GFP nanobody は GFP に結合する領域、SHBG 様ドメインは TAM レセプター(Tyro3, Axl, MerTK)に結合する領域として示される。また、ProS モジュールとは、EGF 様ドメインと SHBG 様ドメインから構成される機能ドメインとして定義される。

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-1-2 Crunch 生産技術の確立

次に、実験に必要な十分量のタンパク質(~10 mg)のタンパク質調製を目的として、遺伝子工学的なアプローチにより Crunch タンパク質生産の最適化が行われた。最初に、哺乳類細胞系におけるナノボディ融合 Crunch の細胞外分泌に最適なシグナル配列のスクリーニングが行われた。マウス Albumin、IL-2、EGF、FGF-9、IgG および CD8a のシグナル配列を GFPNb-Crunch の N 末端に融合させ、HEK293T における一過性発現を行い、上清の Crunch を His-tag アフィニティ精製を行ったのち分泌タンパク質量を確認したところ、マウス CD8a のシグナル配列が最もナノボディ融合の細胞外分泌に適していることが確認された(**Figure.3-1-2A**)。次に、安定した Crunch タンパク質大量生産を目的として、Crunch 高発現安定発現株の樹立が行われた。高発現細胞株は、治療用タンパク質の大量生産に最も使われる、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 CHO に対して、私が新たに樹立した”Repeat Infection-Sorting”法によって実施された。この”Repeat Infection-Sorting”法では、Crunch および tagRFP がコードされたレンチウイルスを細胞に感染させ、tagRFP を指標にフローサイトメトリーによって高 Crunch 発現細胞(高 tagRFP 発現細胞)のソーティングを行う Step を繰り返し行い、高 Crunch 発現細胞株の作製を行う(**Figure.3-1-2B**)。従来のウイルス感染およびソーティングの手法では発現強度の上昇に限度が存在したが、繰り返し感染およびソーティングを行うことにより、より分泌能力の高い Crunch 発現細胞が樹立された(**Figure.3-1-2C**)。また、3 回繰り返すことで得られた CHO/GFPNb-Crunch-S3 株は、 9.54 ± 0.38 mg/L の GFPNb-Crunch が培地変更 6 日目の上清で確認でき(**Figure.3-1-2D**)、これは現在上市されている一本鎖二重特異性抗体 Blinatumomab の最初の論文で報告された 4 mg/L の倍以上の生産量であった(**12**)。また、**項目 2-6-3** の His-tag 精製により、500~1000 mL スケールにおける精製効率がほぼ 100%かつ高純度な Crunch タンパク質を得る手法を確立した(**Figure.2-3, Figure.3-1-E,F**)。

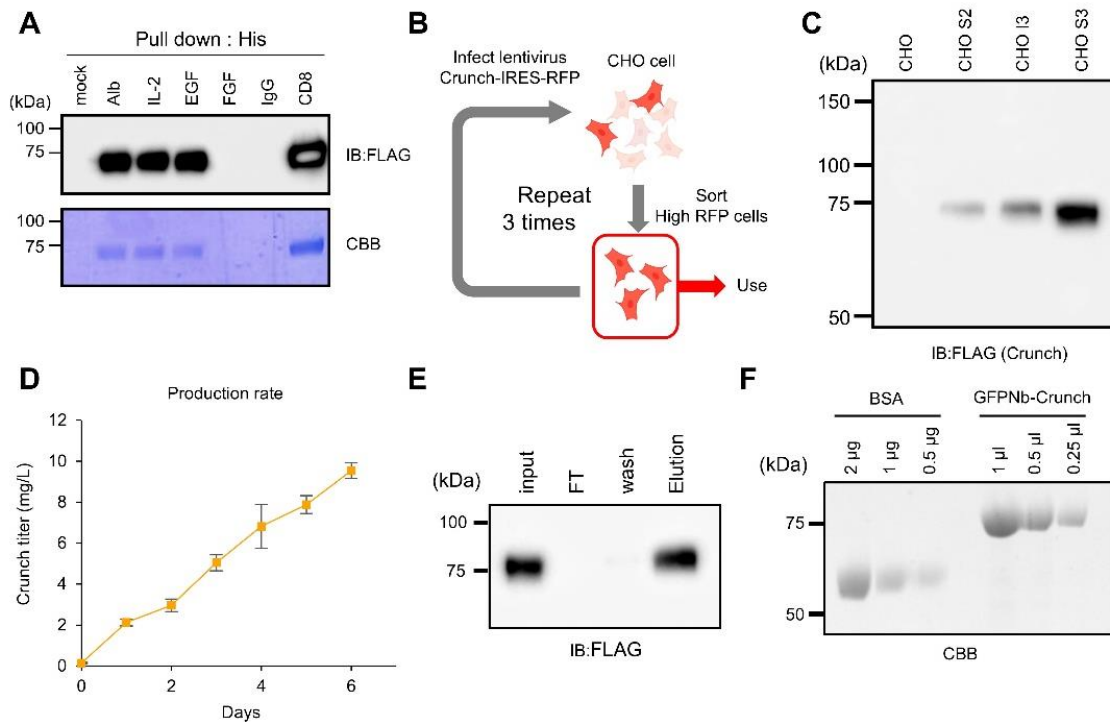


Figure.3-1-2: Crunch の大量生産システム

(A) シグナル配列(SS)スクリーニング。コントロール(mock)プラスミド、Alb (アルブミン SS)、IL-2 (IL-2 SS)、EGF (上皮成長因子 SS)、FGF (線維芽細胞成長因子-9 SS)、IgG (免疫グロブリン G SS)、および CD8 (CD8a SS) を付加した GFPNb-Crunch をコードしたプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清を His タグ精製、WB および CBB 染色した結果を示す。WB は抗 FLAG 抗体が用いられた。

(B-C) 高 Crunch 発現細胞株の樹立。CHO 細胞に Crunch IRES tagRFP をコードするレンチウイルスを感染させ、RFP 高発現細胞をフローサイトメトリーによりソーティングを行うサイクルを三回繰り返し、高 Crunch 発現細胞株(CHO S3)が樹立された(B)。CHO 細胞、サイクルを二回繰り返した細胞(CHO S2)、CHO S2 に一回感染を行った細胞(CHO I3)、CHO I3 をソーティングした細胞(CHO S3)の培養上清を WB 解析した結果を示す。

(D) CHO S3 株の Crunch 分泌。CHO S3 細胞の播種 16 時間後に無血清培地に交換し、毎日上清が回収された。グラフは、上清中の GFPNb-Crunch 濃度は ELISA により測定された結果を示す(平均 ± S.D., n=3)。

(E-F) Crunch の大量精製。CHO S3 細胞の播種 16 時間後に無血清培地に交換し、6 日目に得られた 540 mL の上清が His タグ精製され、得られた溶出サンプルは 1.4 mL の PBS に置換された。His タグ精製中の input、Flow through サンプル(FT)、洗浄サンプル(wash)、溶出サンプル(Elution)は、input サンプルの量に調整され、WB 解析された(E)。WB は抗 FLAG 抗体が用いられた。また、精製 Crunch(0.25-1.0 µL)および BSA(0.5-2.0 µg)が SDS-PAGE、CBB 染色された(F)。濃度は 3.7 mg/mL と計算され、精製効率がほぼ 100%であることから培地中の GFPNb-Crunch 濃度は 9.61 mg/L と推定された。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

3-1-3 モデル標的細胞の作製

前項 3-1-2 で Crunch 生産技術の確立が行われた。次に、モデル標的細胞が作製された。モデル標的細胞は、項目 3-1-1 で説明したモデル標的分子 GFP を細胞表面に発現する細胞であり、GFPNb-Crunch の標的となる。細胞は、ホスファチジルセリン-プロテイン S の作用による影響を排除するため、ユビキタスに発現するスクランブラーゼ(Xkr8(2)および TMEM16F(23))を欠損させた Ba/F3 細胞(BDKO)(24)を利用した。GFP は、マウス CD8a 由来のシグナル配列および CD8a 膜貫通領域を用いることで、細胞表面に発現され(GFPm)、BDKO 細胞の GFPm 発現は共焦点顕微鏡および細胞表面に対する抗 GFP 抗体を用いたフローサイトメトリーにより確認された(Figure.3-1-3A,B)。

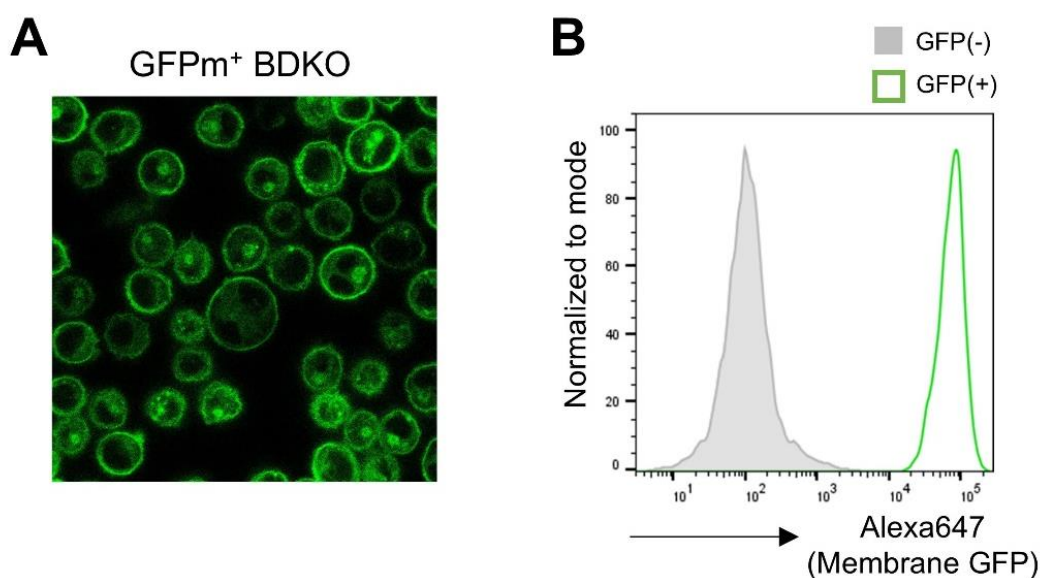


Figure.3-1-3: GFPNb-Crunch のタンパク質特性

(A-B) 細胞表面 GFP 発現。(A)は共焦点顕微鏡を用いて GFPm 発現 BDKO 細胞を撮影した結果を示す。(B)は細胞膜透過処理をせず、抗 GFP 抗体を用いて BDKO 細胞(灰色)および GFPm 発現 BDKO 細胞(緑)の細胞表面を染色した結果を示す。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

3-1-4 Crunch のタンパク質特性

GFPNb-Crunch のタンパク質特性の解析を目的として、生化学アプローチによる解析を行ったところ、GFPNb-Crunch は、タンパク質熱安定性が抗体と同程度であることが確認された(**Figure.3-1-4A,B**)。モデル標的分子である GFP に対する GFPNb-Crunch の結合親和性を確認したところ、GFPNb-Crunch の GFP に対するアフィニティは $K_D=3.88\pm0.47$ nM であり、GFP ナノボディ単体と同程度であることが確認された(**Figure.3-1-4C**)。また、GFP を細胞表面発現したモデル標的細胞に対して GFPNb-Crunch の結合親和性を確認したところ、GFPNb-Crunch はモデル標的分子 GFP 発現特異的に結合することが確認された(**Figure.3-1-4D**)。

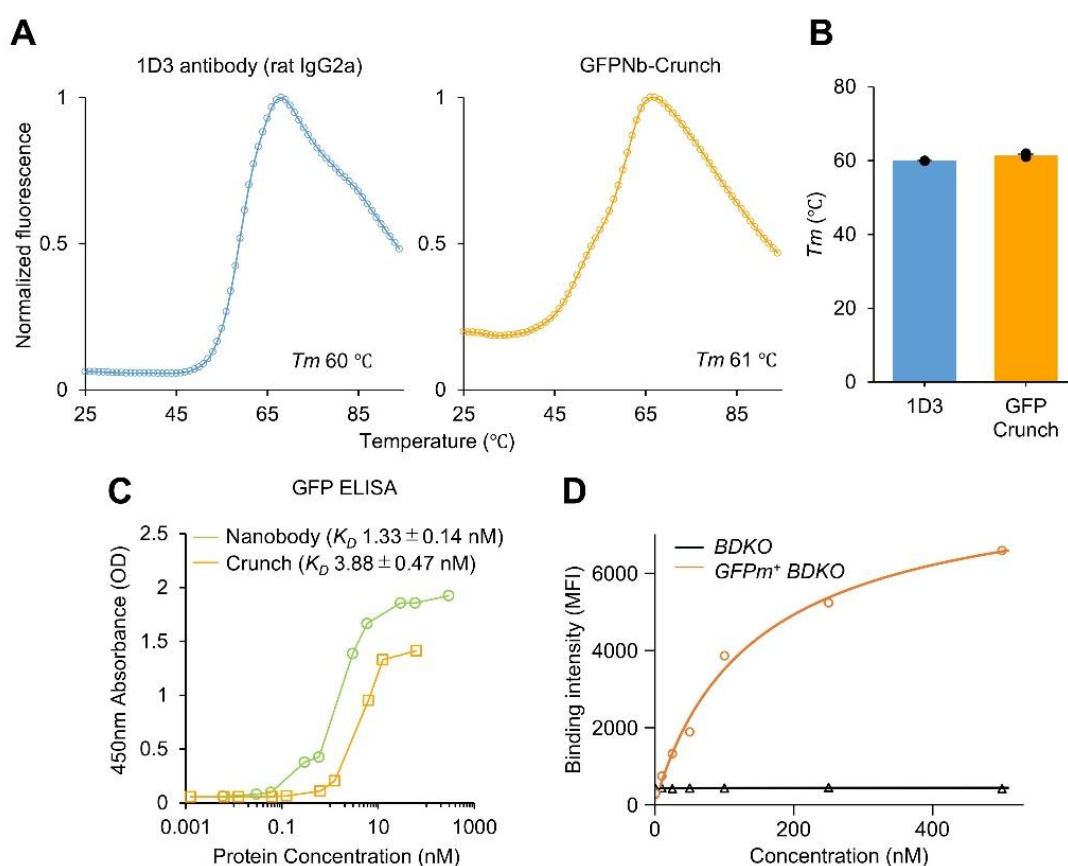


Figure.3-1-4: GFPNb-Crunch のタンパク質特性

(A-B) Crunch の熱安定性。1D3 抗体および GFPNb-Crunch の熱安定性が DSF により測定された。(A)は 3 回の技術的反復の各温度の平均を示す。(B)は凝集が開始する温度(T_m , °C)を示す(平均 ± S.D., n=3)。

(C-D) GFPNb-Crunch の結合親和性。GFP ナノボディおよび GFPNb-Crunch の結合親和性を GFP に対する ELISA により解析された。450nm の吸光度および非線形回帰解析により推定された解離定数(K_d)を示す(C)。GFPNb-Crunch の標的細胞に対する結合親和性は、BDKO 細胞もしくは GFPm 発現 BDKO 細胞への結合アッセイにより評価された(D)。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

3-2 培養系における Crunch の実証

3-2-1 MerTK の貪食シグナル伝達

プロテイン S はアポトーシス細胞表面上の PtdSer を認識、結合し、貪食細胞上の自己リン酸化チロシンキナーゼ MerTK の二量体化を誘導することで、リン酸化、下流のシグナルを誘導し、アポトーシス細胞の貪食を促進する (Figure.1-1)(19, 20)。そこで、Crunch が標的細胞表面上の標的分子を認識し、プロテイン S のように MerTK シグナル伝達経路を誘導できるかが検証された。はじめに、マウス繊維芽細胞株 NIH3T3 に対してマウス MerTK を導入し、発現が問題なく行われることが確認された (Figure.3-2-1A,B)。

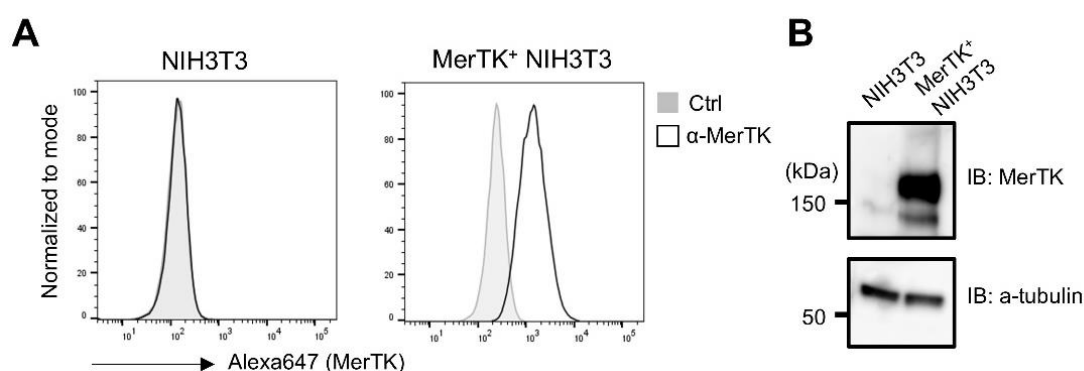


Figure.3-2-1: MerTK 発現細胞

(A-B) MerTK の発現。NIH3T3 細胞および MerTK 発現 NIH3T3 細胞に対し、フローサイトメトリーで抗 MerTK 抗体による染色結果を示す (A)。NIH3T3 細胞および MerTK 発現 NIH3T3 細胞の WB 解析結果を示す (B)。WB は抗 MerTK 抗体および抗 α-tubulin 抗体が用いられた。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

3-2-2 Crunch による MerTK 二量体化の誘導

次に、MerTK の二量体化を検出するため、split-GFP(44)を用いた二量体化 MerTK 検出系を考案した。この系では、split-GFP と結合した MerTK (MerTK-sfGFP) が、リガンドにより二量体化されることで split-GFP が GFP シグナルを示し、二量体化 MerTK を GFP 指標に定量化することが可能となる (Figure.3-2-2A)。この二量体化 MerTK 検出系が機能するかを検証するため、MerTK-sfGFP 発現 NIH3T3 細胞が作製され、プロテイン S を含むウシ胎児血清 (FBS) 存在下でアポトーシス誘導された胸腺細胞と共培養された。その結果、アポトーシス細胞と共培養後に GFP 陽性細胞(二量体化 MerTK 陽性細胞)の増加が確認され (Figure.3-2-2B)、検出系の機能が示された。次に、GFPNb-Crunch が標的細胞存在下で二量体化 MerTK を誘導できるかの検証を目的として、MerTK-sfGFP 発現 NIH3T3 細胞が、GFPNb-Crunch 存在下で標的細胞(GFPm 発現 BDKO 細胞)と共培養された。その結果、GFPNb-Crunch は標的細胞依存的に二量体化 MerTK を誘導することが確認された (Figure.3-2-2C-E)。

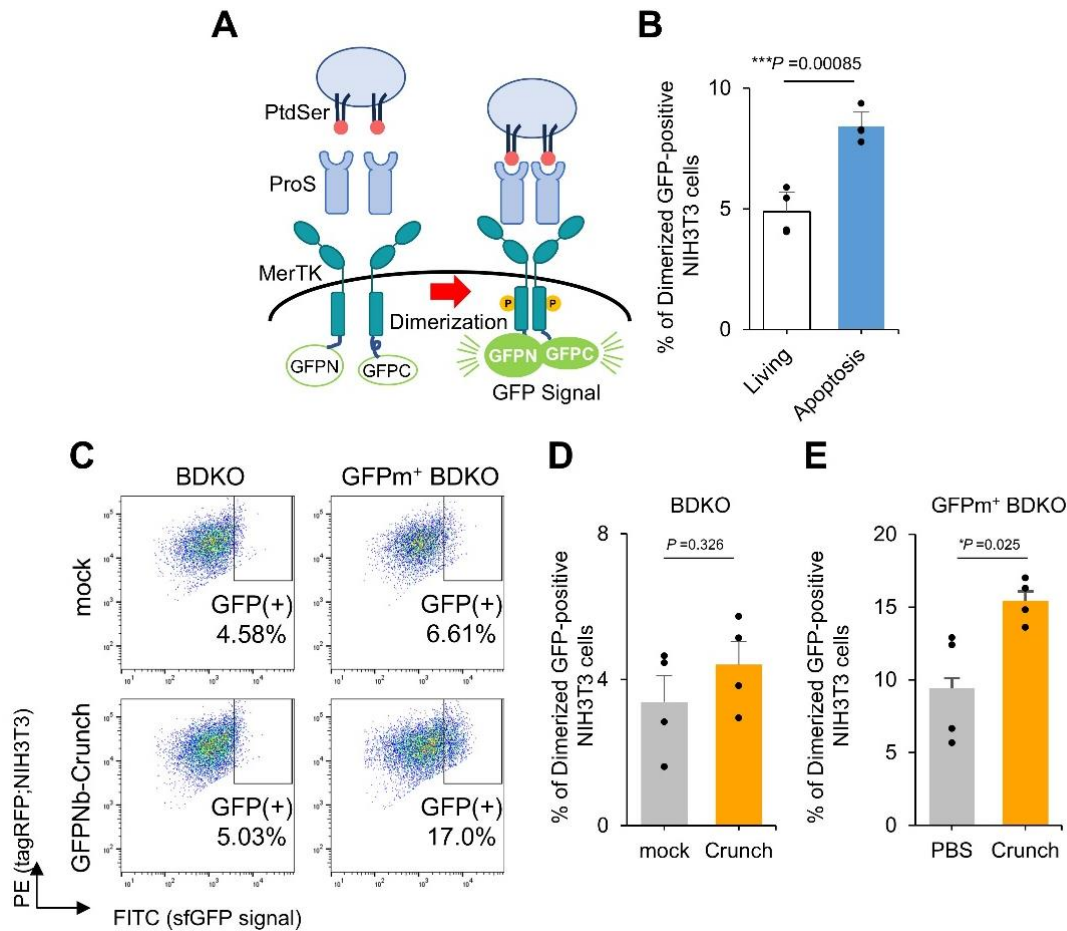


Figure.3-2-2: Crunch による MerTK 二量体化亢進

(A) 二量体化 MerTK 検出系。MerTK に sfGFP1-10(GFPN)および sfGFP11(GFPC)を結合した MerTK-sfGFP が NIH3T3 細胞に導入された(MerTK-sfGFP 発現 NIH3T3 細胞)。ホスファチジルセリン(PtdSer)露出細胞およびプロテイン S(ProS)が MerTK に結合し、二量体化を促進すると、GFPN と GFPC が結合し、GFP 蛍光シグナルが検出される。

(B) アポトーシス胸腺細胞による MerTK 二量体化亢進および検出。標的細胞はマウス胸腺細胞が用いられ、PBS (Living) または Fas リガンド (Apoptosis) で処理された。標的細胞は MerTK-sfGFP 発現 NIH3T3 細胞に添加され、共培養後フローサイトメトリーにより GFP シグナルが検出された。グラフは、GFP 陽性細胞(二量体化 MerTK 陽性細胞)の割合を示す(平均値 $\pm$ SD, n=4)。(C-E) GFPNb-Crunch による MerTK 二量体化亢進。標的細胞は BDKO 細胞または GFPm 発現 BDKO 細胞が用いられた。Crunch は、HEK293T 細胞にコントロール(mock)プラスミドもしくは GFPNb-Crunch をコードしたプラスミドのトランスフェクションにより、培養上清として得られた。標的細胞と培養上清は MerTK-sfGFP 発現 NIH3T3 細胞に添加され、共培養後フローサイトメトリーにより共培養後フローサイトメトリーにより GFP シグナルが検出された(C)。グラフは、GFP 陽性細胞(二量体化 MerTK 陽性細胞)の割合を示す(D,E)(平均値 $\pm$ SD, n=4)。

Student unpaired *t* test(B,D-E). N.S. $P>0.05$, * $P<0.05$, *** $P<0.0001$.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-2-3 Crunch による MerTK リン酸化の誘導

次に、Crunch による MerTK のリン酸化誘導を検証した。標的細胞および GFPNb-Crunch が MerTK 発現 NIH3T3 細胞に添加され、共培養を行ったのち MerTK のリン酸化レベルが WB により測定された。その結果、標的細胞、GFPNb-Crunch、また共培養時間依存的に MerTK リン酸化が誘導されることが確認された(**Figure.3-2-3A-C**)。また、GFPNb-Crunch のによる標的細胞依存的 MerTK リン酸化誘導は、抗 GFP ポリクローナル抗体の添加によって阻害され、GFPNb-Crunch が標的細胞表面上の GFP に特異的に MerTK リン酸化を誘導することが確認された(**Figure.3-2-3D**)。

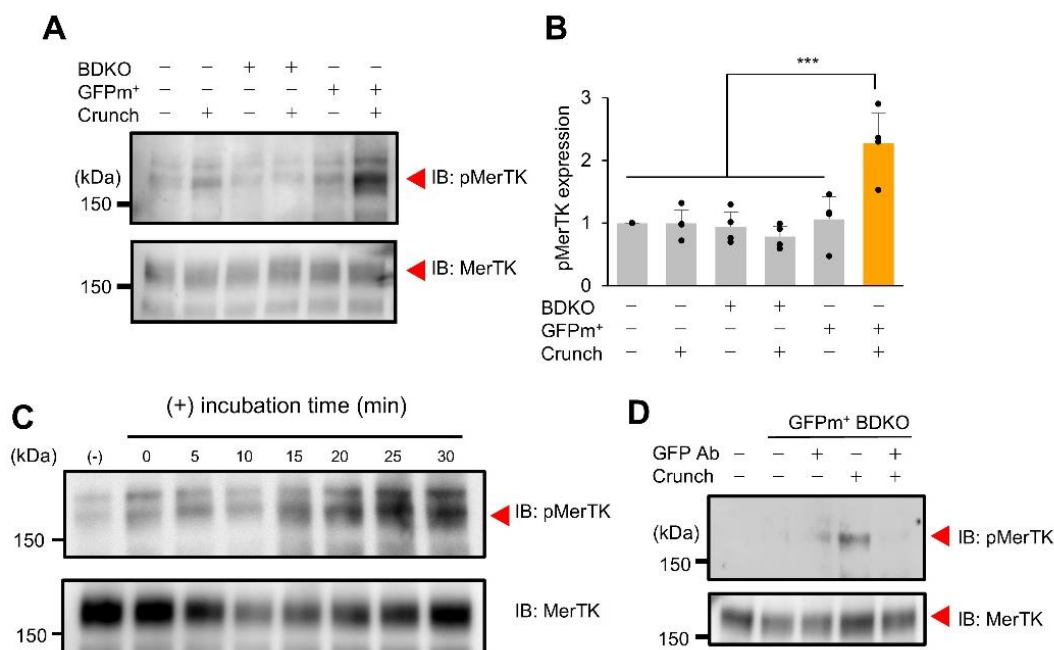


Figure.3-2-3: Crunch による MerTK リン酸化誘導

(A-B) GFPNb-Crunch による MerTK リン酸化誘導。標的細胞は BDKO 細胞または GFPm 発現 BDKO 細胞が用いられた。MerTK 発現 NIH3T3 細胞に標的細胞および Crunch(0 または 5 $\mu\text{g/mL}$) を加え、遠心後 15 分間共培養された。MerTK 発現 NIH3T3 細胞は溶解され、WB によりリン酸化 MerTK レベルが解析された(A)。WB は抗リン酸化 MerTK 抗体(pMerTK)および抗 MerTK 抗体が用いられた。(B)は pMerTK シグナルの定量結果を示す(平均値 $\pm$ SD, n=4)。(C) GFPNb-Crunch によるリン酸化誘導の時間依存性。標的細胞は GFPm 発現 BDKO 細胞が用いられた。MerTK 発現 NIH3T3 細胞に標的細胞および Crunch(0(-)または 1 $\mu\text{g/mL}$ (+))を加え、遠心後 0~30 分間共培養され、(A)と同様に解析された。(D)GFPNb-Crunch によるリン酸化誘導の GFP 依存性。(A)の条件に抗 GFP ポリクローナル抗体を添加し、GFPNb-Crunch による GFP の結合を阻害する条件を追加して行われた。one-way ANOVA with Tukey-Kramer *t* test(B). ****P*<0.0001.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-2-4 Crunch による MerTK 下流シグナルの誘導

次に、Crunch によって MerTK の下流シグナル伝達が活性化されるかを検証するため、細胞生存アッセイが実施された。IL-3 要求性の Ba/F3 細胞は、IL-3 が枯渇した状態では生存することができないが、MerTK シグナルが活性化されると生存可能であることが知られている(45)。MerTK および GFPm 発現 Ba/F3 細胞を、IL-3 枯渇条件で培養すると、GFPNb-Crunch を添加することで標的分子依存的に生細胞数および生存率の促進が起こり、GFPNb-Crunch が標的分子特異的に MerTK の下流シグナルを誘導することが確認された (Figure.3-2-4)。

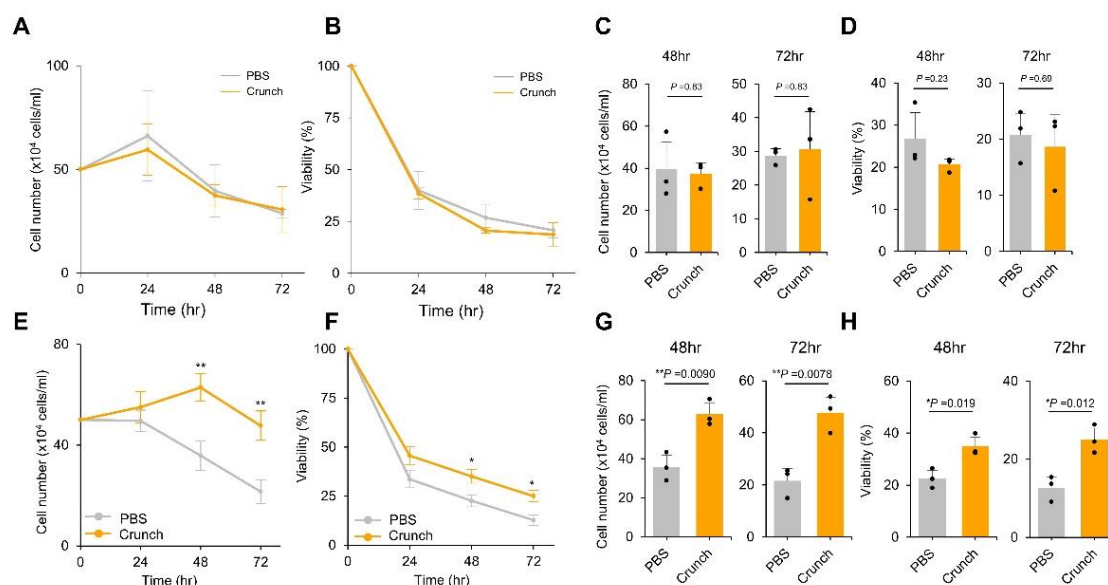


Figure.3-2-4: Crunch による細胞生存

(A-H) GFPNb-Crunch による細胞生存アッセイ。MerTK 発現 Ba/F3 細胞(A-D)および MerTK および GFPm 共発現 Ba/F3 細胞(E-H)を、PBS または GFPNb-Crunch を加えた IL-3 欠損 RPMI1640 培地で培養し、24 時間ごとに生存細胞数(Cell number)および生存率(Viability)を測定した結果を示す。(A-B, E-F)は生存細胞数と生存率の時間推移、(C-D, G-H)は 48 時間、72 時間での生存細胞数と生存率を示す(平均値 ± SD, n=3)。

Student unpaired *t* test(C-D, G-H). N.S. *P* > 0.05, **P* < 0.05.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-2-5 Crunch による標的細胞の貪食誘導

次に、Crunch が標的細胞の貪食を誘導できるかどうかを検証した。標的分子 GFP を細胞膜表面に発現する *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスから採取した胸腺細胞が標的細胞として使用され、pH 感受性色素 pHrodo-Red で標識されたのち、MerTK 発現 NIH3T3 細胞(貪食細胞)に添加、そして GFPNb-Crunch の存在下で共培養された。その結果、GFPNb-Crunch は貪食細胞による標的細胞の貪食を血清濃度依存的に誘導することが確認された(**Figure.3-2-5A-C**)。また、この GFPNb-Crunch による貪食誘導は MerTK を発現しない NIH3T3 細胞では確認できず、Crunch の貪食誘導効果は MerTK 依存的なことが確認された(**Figure.3-2-5D,E**)。また、Crunch のヒト応用性を確認するため、マウスプロテイン S 配列をヒトプロテイン S 配列にすることでヒト型 GFPNb-Crunch を作製したところ、ヒト型 GFPNb-Crunch はヒト MerTK 発現 NIH3T3 細胞の標的細胞貪食を誘導が見られ、Crunch のヒト応用性が確認された(**Figure.3-2-5F**)。さらに、GFPNb-Crunch はマウスから回収された生体マクロファージにおいても、血清濃度依存的に標的細胞の貪食を誘導することが確認された(**Figure.3-2-5G**)。

上記の結果は、Crunch が標的細胞表面上の標的分子を認識し、MerTK の二量体化、リン酸化、シグナル伝達、そして貪食細胞による標的細胞の貪食を誘導することを示すものである。

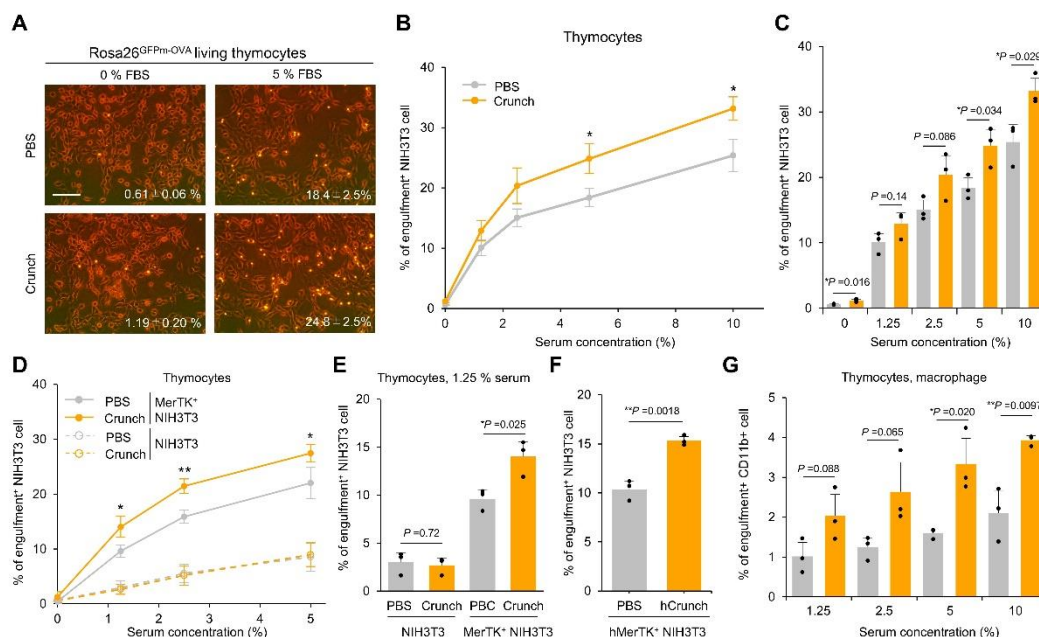


Figure.3-2-5: Crunch による標的細胞貪食

(A-C) GFPNb-Crunch による GFPm 発現細胞貪食誘導。標的細胞は *Rosa26^{GFPm}-OVA* マウス由来胸腺細胞が用いられた。標的細胞は、pHrodo-Red で標識され、FBS を 0~10% および PBS または GFPNb-Crunch (10 μ g/mL) を添加された DMEM と共に MerTK 発現 NIH3T3 細胞 (貪食細胞) に加えられ、共培養された。共培養後、標的細胞を洗浄により除去し、貪食細胞が顕微鏡により観察された (A)。赤色の蛍光シグナルは標的細胞を貪食したリソソームを示す。図は $\times 100$ 倍、スケールバー 250 μ m、右下は pHrodo-Red 陽性細胞 (貪食陽性細胞) の割合を示す (B より、平均 $\pm$ SD、 $n=3$)。フローサイトメトリーにより解析された貪食陽性細胞の割合を (B) および (C) に示す (平均 $\pm$ SD、 $n=3$)。

(D-E) Crunch による貪食誘導の MerTK 依存性。貪食細胞は NIH3T3 細胞と MerTK 発現 NIH3T3 細胞が用いられた。(A) と同様に貪食アッセイが行われ、各 FBS 濃度での貪食陽性細胞の割合を示す。(E) は、1.25% FBS の結果を示す (平均 $\pm$ SD、 $n=3$)。

(F) ヒト型 GFPNb-Crunch による貪食誘導。貪食細胞はヒト MerTK 発現 NIH3T3 細胞が用いられ、5% FBS、ヒト型 GFPNb-Crunch (10 μ g/mL) の条件で貪食アッセイが行われた。貪食陽性細胞の割合を示す (平均 $\pm$ SD、 $n=3$)。

(G) 生体マクロファージによる Crunch 依存的貪食。貪食細胞はマウス腹腔から回収されたマクロファージが用いられた。5% FBS の条件下で (A) と同様に貪食アッセイが行われ、貪食陽性細胞の割合を示す (平均 $\pm$ SD、 $n=3$ マウス)。

Student unpaired *t* test (B-E). N.S. $P>0.05$, * $P<0.05$.

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

3-3 生体系における Crunch の実証

3-3-1 脾細胞移植マウスモデルにおける生体内からの標的細胞除去

Crunch がマウス体内で標的細胞を除去できるかを検証するため、*Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスから採取した脾細胞を標的細胞とし、野生型 (WT) マウスに静脈内投与、不要細胞蓄積を模倣した脾細胞移植マウスモデルを考案した (**Figure.3-3-1A**)。このモデルでは、*Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスから採取した脾細胞を移植したマウスで、移植 4 日後に脾臓および血液中の GFP 陽性細胞の増加が確認された (**Figure.3-3-1B**)。脾細胞移植翌日に GFPNb-Crunch を 100 μ g 腹腔内投与したマウスでは、GFP 陽性細胞の減少が確認された (**Figure.3-3-1C-E**)。また、GFPNb-Crunch が投与されたマウスの総脾細胞数は、未投与マウスと同程度であったため、Crunch の毒性は低いと考えられる (**Figure.3-3-1F**)。

次に、GFPNb-Crunch の標的細胞除去効果が貪食に依存するかを検証するため、生体内貪食アッセイを考案した (**Figure.3-3-1G**)。*Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスから採取した脾細胞を pHrodo-Red で標識後、WT マウスに静脈内投与し、その 2 時間後に GFPNb-Crunch を 100 μ g 腹腔内投与した。移植 24 時間後に移植マウス脾臓の貪食細胞を解析したところ、GFPNb-Crunch 投与マウスでは GFP 陽性細胞数に大きな減少は認められなかったが、MerTK 陽性細胞および F4/80 陽性マクロファージにおいて標的細胞貪食が亢進していることが確認された (**Figure.3-3-1H,I**)。上記の結果により、Crunch は MerTK 陽性細胞、F4/80 陽性マクロファージなどの貪食細胞を介して、生体内で標的細胞を貪食により除去することが示された。

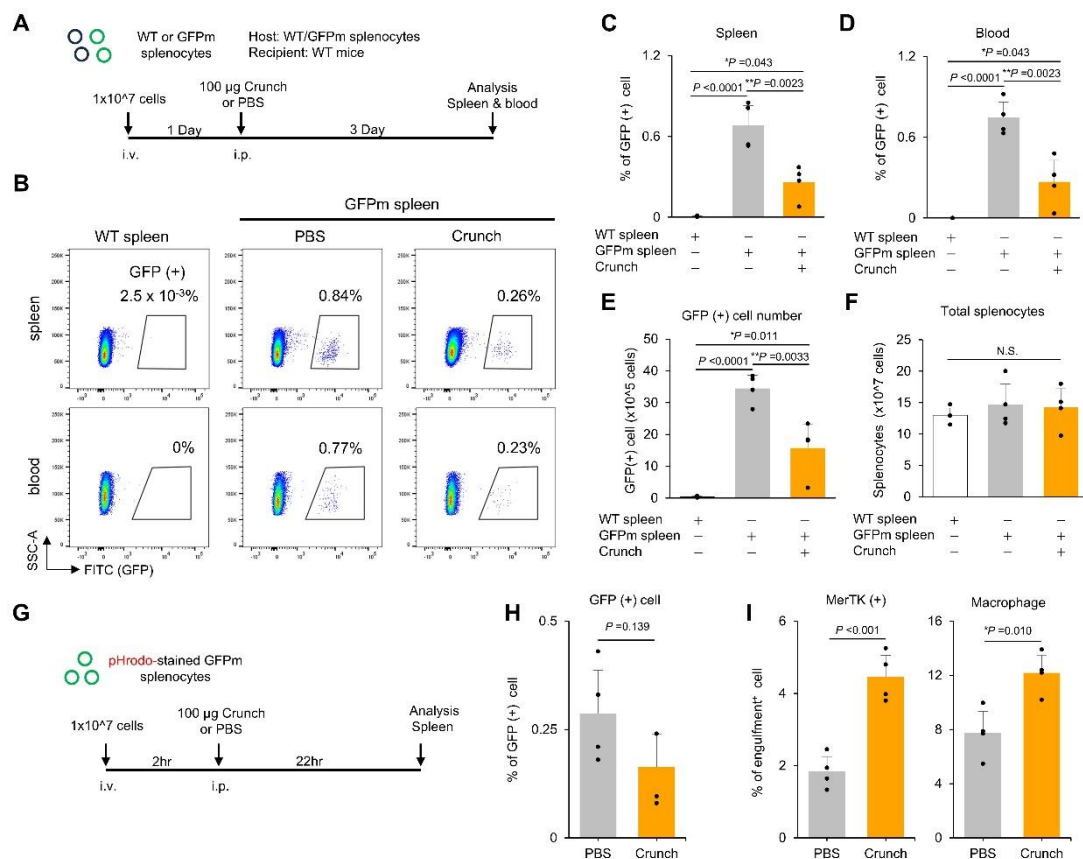


Figure.3-3-1: 脾細胞移植モデルマウス

(A) 脾細胞移植モデルの概略図。WT および *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスの脾細胞(1×10^7 細胞)が WT マウスに静脈内投与され、投与 1 日後に PBS または GFPNb-Crunch(100 µg)が投与された。脾細胞投与 4 日後に脾臓および血液の細胞がフローサイトメトリーにより解析された。

(B-F) Crunch による生体内での GFPm 細胞の除去。(B)は脾細胞投与 4 日後の脾臓および血液細胞のフローサイトメトリーによるドットプロットを示す。移植された GFP 陽性細胞の割合は gating により囲まれた領域が示す。脾臓(C)および血液(D)細胞中の GFP 陽性細胞の割合を示す。(E)は脾臓中の GFP 陽性細胞数を示す。(F)は総脾細胞数を示す(平均値 ± SD, n=4 マウス)。

(G) 生体内貪食アッセイの概略図。pHrodo-Red で標識された *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウスの脾細胞が WT マウスに静脈投与され、投与 2 時間後に PBS または GFPNb-Crunch(100 µg)が投与された。脾細胞投与 24 時間後に脾臓および血液の細胞がフローサイトメトリーにより解析された。

(H-I) Crunch による生体内細胞貪食誘導。(H)は脾細胞投与 24 時間後の脾臓細胞中の GFP 陽性細胞の割合を示す。(I)は脾臓細胞中の MerTK 陽性細胞または F4/80 陽性マクロファージの貪食陽性細胞の割合を示す(平均値 ± SD, n=4 マウス)。

one-way ANOVA with Tukey-Kramer *t* test(C-F). Student unpaired *t* test(H-I). N.S. $P > 0.05$, * $P < 0.05$.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-3-2 腫瘍移植マウスモデルにおける生体内からの標的細胞除去

次に、Crunch による標的細胞除去が疾患治療に応用できるかを検証するため、B16F10 マウスメラノーマ細胞の移植モデルを用いた(46)。はじめに、標的分子 GFP を細胞膜表面に発現した B16F10 細胞(GFP^{m+} B16F10 細胞)を作製した。この B16F10 細胞を WT マウス後肢に皮下接種を行い、腫瘍サイズが 4 mm³ に到達する移植 7 日目から 2 日ごとに計 3 回の GFPNb-Crunch 投与を行い、Crunch の腫瘍形成後における治療効果を検証した(Figure.3-3-2-1A)。その結果、腫瘍の増殖は GFPNb-Crunch 治療によって顕著に抑制され、移植 16 日目に摘出した腫瘍サイズ、重量の減少が確認された(Figure.3-3-2-1B-F)。また、GFPNb-Crunch による治療により、マウスの生存期間延長も確認された(Figure.3-3-2-1G)。

次に、GFPNb-Crunch 治療における腫瘍標的において、標的分子 GFP の細胞膜表面発現の重要性を検証するため、細胞内に GFP を発現する B16F10 細胞(GFP⁺ B16F10 細胞)を作製し、移植実験を行った。その結果、GFP⁺ B16F10 細胞移植マウスでは、GFP^{m+} B16F10 細胞移植マウスで見られた GFPNb-Crunch による治療効果が見られなかった(Figure.3-3-2-1H,I)。この結果から、Crunch による標的化には、細胞膜表面での標的分子の発現が重要であり、Crunch が標的特異性を持つことが示された。

次に、このメラノーマを標的とした Crunch 治療モデルにおけるエフェクター細胞を明らかにするため、ヒトメラノーマ患者由来のデータセット(37)を scRNA-seq 解析したところ、腫瘍環境内のマクロファージおよび内皮細胞において MerTK の発現が確認され、マクロファージと内皮細胞が Crunch 治療におけるエフェクター細胞だと予想された(Figure.3-3-2-2A,B)。また、B16F10 移植モデルにおいては、CD11b⁺ Ly6C^{int} F4/80^{high} マクロファージが MerTK の主要発現細胞だと確認された(Figure.3-3-2-2C-E)。これらの結果は、腫瘍随伴マクロファージが Crunch 治療において腫瘍貪食に関与していることを示唆する。

最後に、Crunch 治療が腫瘍転移に与える影響を検証した。GFP^m 発現 B16F10 細胞を静脈内注入後、2 日ごとに計 3 回の GFPNb-Crunch 投与を行った(Figure.3-3-2-2F)。移植 14 日後にマウスの肺を解析したところ、GFPNb-Crunch 治療により肺転移の抑制が確認された(Figure.3-3-2-2G,H)。

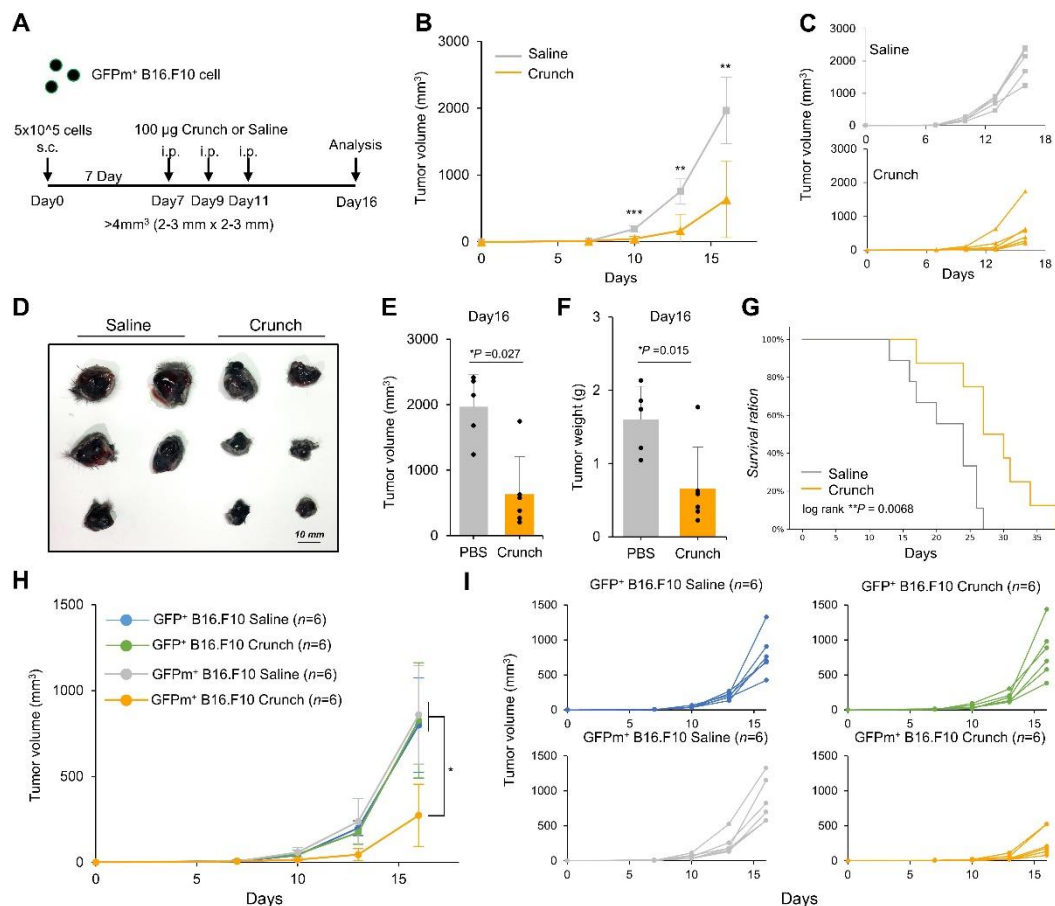


Figure.3-3-2-1: 腫瘍移植マウスモデル

(A) メラノーマ移植モデルに対する Crunch 治療の概略図。GFPm* B16F10 細胞(5×10^5 細胞)が WT マウスの後肢皮下接種され、接種 7 日後に腫瘍サイズが 4 mm^3 より大きいことが確認されたマウスに対し、Saline または GFPNb-Crunch($100 \text{ }\mu\text{g}$)が腹腔内投与され、9 日後、11 日後にも同様に投与された。腫瘍移植 16 日後に実験が終了された。

(B-F) Crunch 治療による腫瘍増殖抑制。腫瘍移植 7 日後から 3 日間ごとに測定された腫瘍サイズを示し、(B)は平均値、(C)は各マウスの値を示す。(D)は実験終了時に摘出された腫瘍の写真を示す。実験終了時の腫瘍サイズ(E)と腫瘍重量(F)を示す(平均 $\pm$ SD, Saline:n=5 マウス, Crunch:n=6 マウス)。

(G) Crunch 治療による生存期間の延長。Saline 治療群と Crunch 治療群における Kaplan-Meier 生存曲線を示す(Saline:n=9 マウス, Crunch:n=8 マウス)。Log-rank 検定により群間の有意差が比較された。

(H-I) Crunch 治療の特異性。GFPm* B16F10 および GFP* B16F10 が WT マウスに皮下接種され、(A)と同様の処置がされた。腫瘍移植 7 日後から 3 日間ごとに測定された腫瘍サイズを示し、(H)は平均値、(I)は各マウスの値を示す(平均 $\pm$ SD, Saline:n=9 マウス, Crunch:n=8 マウス)。one-way ANOVA with Tukey-Kramer t test(H). Student unpaired t test(B,E-F).N.S. $P>0.05$, * $P<0.05$, *** $P<0.0001$.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

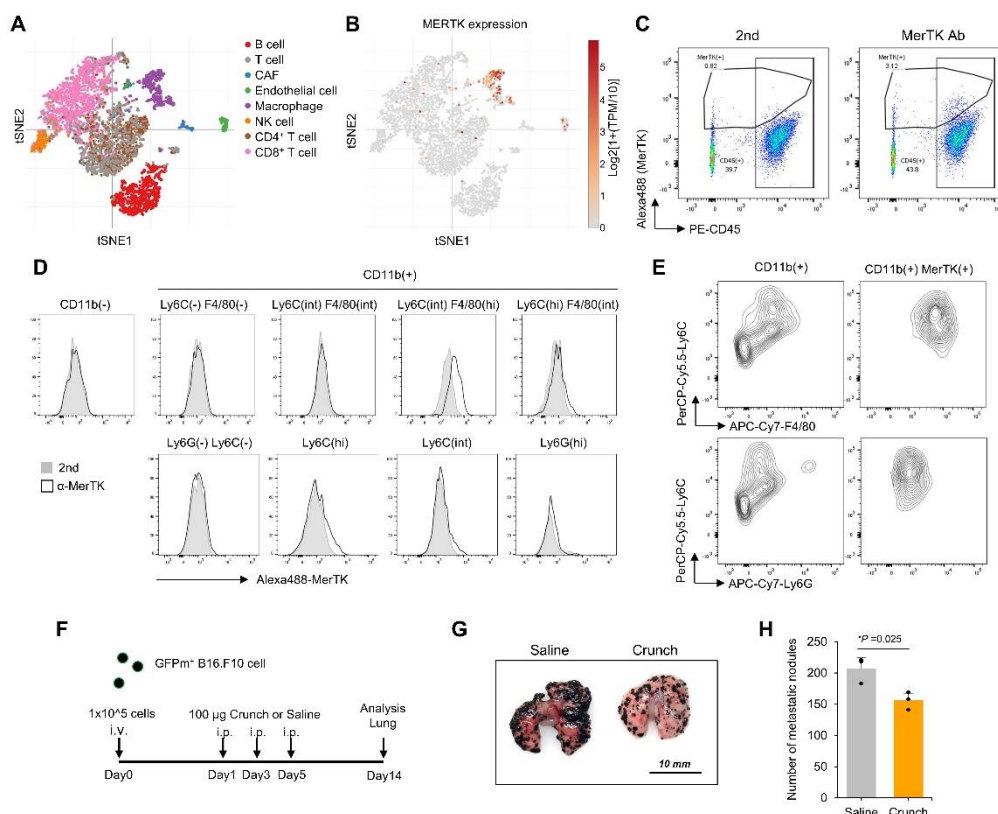


Figure.3-3-2-2: Crunch のエフェクター細胞

(A-B) ヒトメラノーマ腫瘍微小環境における非悪性細胞の t-SNE 解析。ヒトメラノーマ患者のシングルセルデータセット (GSE115978, 4857 細胞、非悪性細胞) を元に t-SNE クラスタリングが行われ、B 細胞、T 細胞、がん関連繊維芽細胞 (CAF)、血管内皮細胞、マクロファージ、NK 細胞、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞の各細胞群に分類された (A)。各細胞における MerTK の発現を示す (B)。

(C-E) B16F10 移植モデルにおける腫瘍微小環境中の MerTK 発現細胞。B16F10 細胞 (5×10^5 細胞) が WT マウスの後肢皮下接種され、移植 9 日目に原発腫瘍を摘出、単一細胞に分離され、フローサイトメトリーにより解析された。(C) は抗 MerTK 抗体染色およびコントロール染色の結果を示す。(D) は各細胞ポピュレーションにおける MerTK 発現を示す。(E) は CD45 陽性 CD11b 陽性または CD45 陽性 CD11b 陽性 MerTK 陽性細胞について Ly6C-F4/80 または Ly6C-Ly6G で展開したフローサイトメトリーの結果を示す。

(F) 肺転移モデルに対する Crunch 治療。GFPm⁺ B16F10 細胞 (1×10^5 細胞) が WT マウスに静脈投与され、投与 1 日後に Saline または GFPNb-Crunch (100 μ g) が腹腔内投与、3 日後、5 日後にも同様に投与された。投与 14 日後に実験が終了され、肺が摘出された。

(G-H) Crunch 治療による肺転移抑制。実験終了時に摘出された肺を (G) に示す。(H) は摘出された肺表面における転移結節数を示す (平均 $\pm$ SD, n=3 マウス)。

Student unpaired *t* test (H). **P* < 0.05.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-4 Crunch の薬物動態プロファイル

3-4-1 Crunch の生体内半減期

これまでの結果から、Crunch が生体内の標的細胞を貪食により除去することが示された。次に、Crunch の医薬品応用を目的として、Crunch の薬物動態プロファイルの調査を行った。医薬品の半減期は、血中薬物濃度が半減するまでに要する時間を指し、薬物の代謝および排泄に影響され、医薬品の効能や作用期間の指標となるものである。Crunch の血漿中半減期の測定を目的として、GFPNb-Crunch を腹腔内 (i.p.) および静脈内 (i.v.) に投与し、投与後 10 分から 120 時間にかけて血漿中残存 Crunch 濃度を測定した (Figure.3-4-1A)。その結果、Crunch の血漿中半減期は、静脈内投与で 11.4 時間、腹腔内投与で 15.0 時間であることが確認された (Figure.3-4-1B,C)。

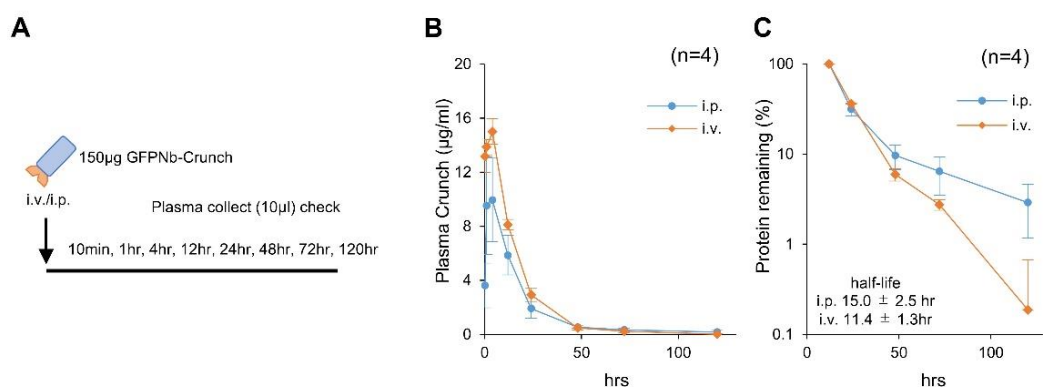


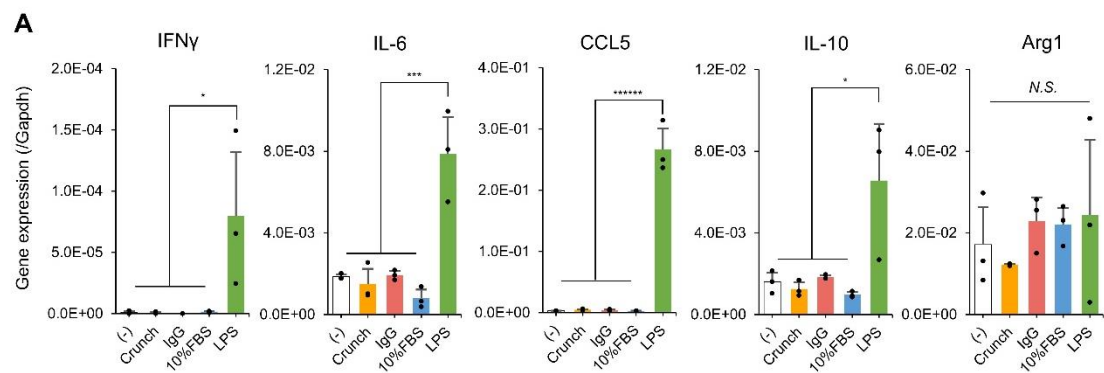
Figure.3-4-1: Crunch の生体内半減期

(A) Crunch の血中半減期測定のプロット。GFPNb-Crunch(150 µg)が WT マウスに静脈投与もしくは腹腔内投与され、投与 10 分後、1 時間後、4 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時間後、120 時間後に血漿が回収され、血漿中 Crunch 濃度が ELISA により測定された。(B-C) Crunch の生体内半減期。(B)は測定された血漿中 Crunch 濃度を示す。(C)は 12 時間後を 100%として、12 時間後から 120 時間後の残存 Crunch 量を示す(平均±SD, n=4 マウス)。12 時間後以降の血漿中残存量を用いて、半減期を算出した。

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

3-4-2 Crunch の安全性試験

医薬品は、その有効性だけではなく、安全性が確保されている必要がある。そこで、Crunch の安全性を評価するため、安全性試験を行った。プロテイン S を介した MerTK シグナル経路は、一般に抗炎症反応を誘導することが知られている(21)。そのため、Crunch の免疫応答反応は低いと考えられる。これを確認するため、GFPNb-Crunch をマクロファージに添加し、免疫応答反応を測定した。その結果、GFPNb-Crunch はサイトカイン発現の増加を引き起こさないことが確認された(Figure.3-4-2A)。次に、免疫原性の評価を目的として、T 細胞応答および B 細胞応答が確認された。NetMHC4.1(36)を用いて、GFPNb-Crunch の MHC クラス 1 分子に対する抗原提示を予測したところ、Gla ドメインをナノボディに置換する Crunch の改変は、プロテイン S 由来の機能モジュール(ProS モジュール)に対してエピトープ数の増加は確認されなかった(Figure.3-4-2B)。また、Bepi-Pred-2.0(35)を用いて、GFPNb-Crunch およびプロテイン S の B 細胞エピトープを予測したところ、ProS モジュール内のエピトープ性は GFPNb-Crunch とプロテイン S で同程度であった(Figure.3-4-2C)。一方で、標的結合モジュールであるナノボディは高いエピトープ性が示された。この点について評価するため、生体内免疫原性アッセイが行われた。GFPNb-Crunch および GFP (コントロールタンパク質)をマウスに静脈内投与を行い、投与 24 日後に血中抗薬物抗体が確認された。その結果、GFPNb-Crunch を投与されたマウスでは、GFPNb に対する抗体は誘導されたが、ProS モジュールに対する抗体は確認されなかった(Figure.3-4-2D,E)。この結果は、ProS モジュールが Crunch 改変による新規エピトープを獲得しなかったことを示している。以上の結果から、Crunch の免疫原性は主に標的結合モジュールに依存していることが示唆された。



B

T cell(H-2-kb) epitope prediction of ligands using NetMHC 4.1.			
ligands	Number of strong binders	Number of weak binders	Number of peptides
mProS	10	12	668
GFPNb Crunch	11	11	685
GFP nanobody	3	1	126
scGFP Crunch	12	15	815
scFv GFP	4	5	256

Binding of 8-mer peptides against representative H-2-kb.
Rank threshold for strong binding peptides: 0.5
Rank threshold for weak binding peptides: 2.0

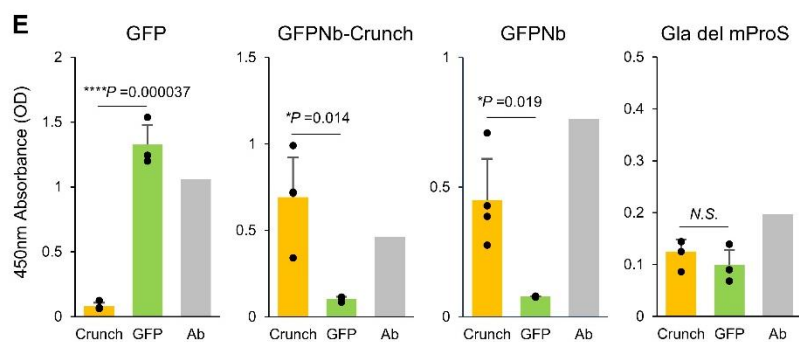
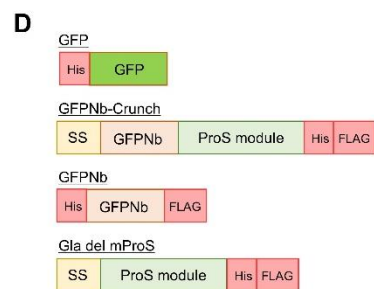
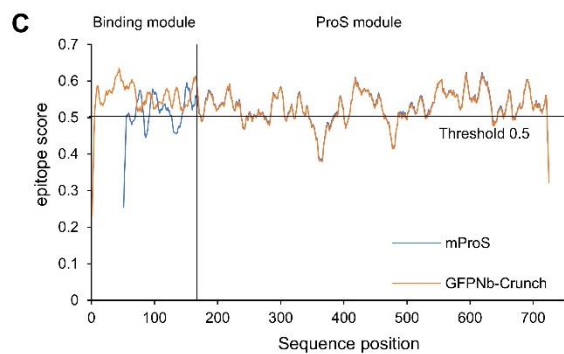


Figure.3-4-2: Crunch 免疫原性

(A) Crunch の免疫応答。GFPNb-Crunch (10 $\mu\text{g/mL}$)、mouse IgG2a (10 $\mu\text{g/mL}$)、10% FBS、Lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/mL) をマクロファージに添加し、24 時間培養された。培養後のマクロファージ IFN γ 、IL-6、CCL5、IL-10、Arg1 の mRNA 発現レベルを示す(平均 $\pm$ SD, $n=3$)。LPS は、マクロファージの自然免疫応答の陽性コントロールとして用いられた。

(B) Crunch の T 細胞エпитープ。マウスプロテイン S (mProS)、GFPNb-Crunch、GFP nanobody、scGFP-Crunch、scFv GFP のアミノ酸配列の T 細胞エпитープ数が NetMHC4.1 により解析された。H-2-kb に対する 8-mer ペプチドで評価し、強いエпитープ (rank ≤ 0.5) と弱いエпитープ (rank ≤ 2.0) の基準で分類された。scGFP-Crunch は GFP に対するマウスモノクローナル抗体の scFv を用いて設計された Crunch である。

(C) Crunch の B 細胞エпитープ。mProS と GFPNb-Crunch の B 細胞エпитープスコアが BepiPred-2.0 により解析された。Threshold は 0.5 とした。

(D-E) Crunch の ADA。His-GFP および GFPNb-Crunch (150 μg) がマウスに静脈内投与され、投与 24 日後に血漿が回収された。血漿中の抗体は、His-GFP (GFP)、GFPNb-Crunch、GFPNb、Gla ドメイン欠損 mProS (Gla del mProS) に対しての ELISA で評価された(D)。各タンパク質に対して行った ELISA の OD450nm の値を示す(平均 $\pm$ SD, Crunch $n=4$, GFP $n=3$)(E)。GFP は mouse anti-GFP IgG2a antibody(100 ng/mL)、他のタンパク質は mouse anti-FLAG IgG1 antibody(100 ng/mL) が陽性コントロールとして用いられた。

Student unpaired t test(E). *N.S.* $P>0.05$, * $P<0.05$, **** $P<0.00001$.

(Yamato et al. 2025. *Nature Biomedical Engineering* を改変)

3-5 内在性分子の標的化および治療応用

3-5-1 一本鎖抗体(scFv)への応用

ここまでの結果から、GFP ナノボディを用いた Crunch の Proof of Concept が確認された。次に、Crunch の標的を拡大化するため、標的結合モジュールをナノボディから一本鎖抗体(scFv)への変更およびその検証実験を考案した。抗体の可変領域をリンカーで結合させた scFv は、二重特異性抗体や CAR-T 細胞による標的分子の標的化で用いられている(12, 22)。そこで、内在性分子の標的化および Crunch の scFv 応用性検証を目的として、マウス CD19 (mCD19)に対するラットモノクローナル抗体(1D3)の scFv(30)を利用し mCD19 標的 Crunch (scCD19-Crunch) を設計した(Figure.3-5-1A)。この scCD19-Crunch は AlphaFold2 によって、scFv と ProS モジュールの立体障害が生じないことが確認された(Figure.3-5-1B)。また、この scCD19-Crunch は mCD19 陽性細胞特異的に結合し(Figure.3-5-1C)、MerTK リン酸化を誘導(Figure.3-5-1D)、貪食細胞によるマウス脾細胞の貪食を促進することが確認された(Figure.3-5-1E,F)。

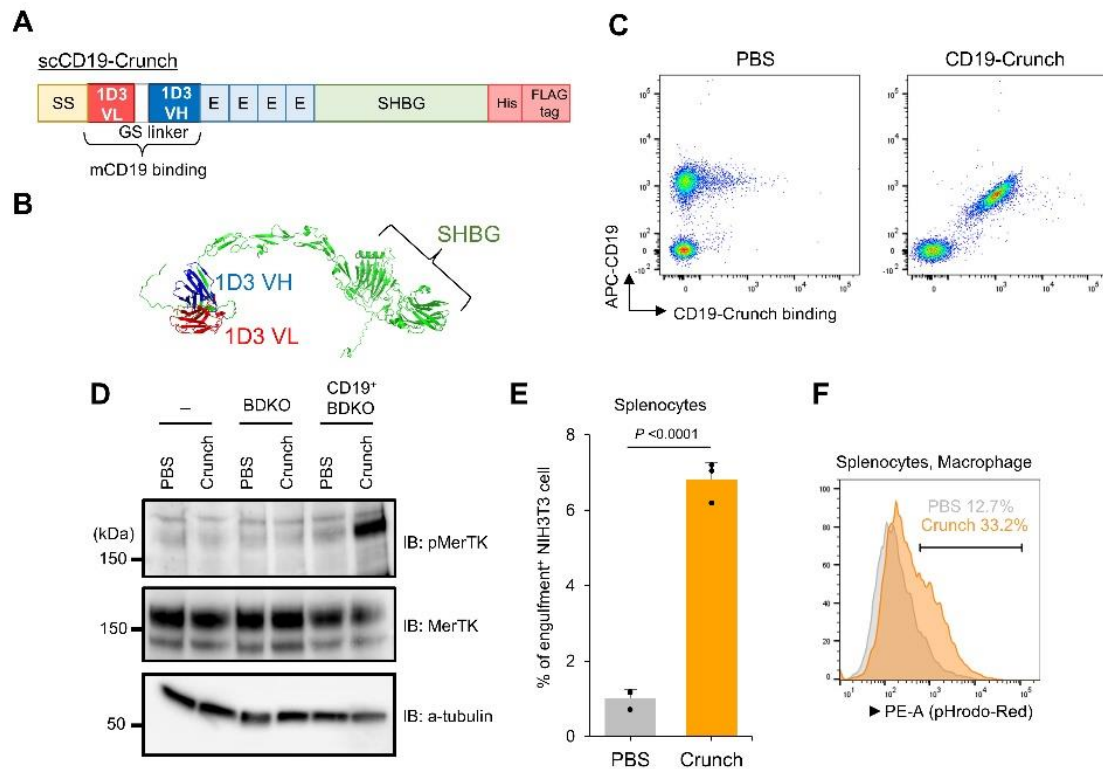


Figure.3-5-1: scCD19-Crunch の検証

(A) scCD19-Crunch の概略図。scCD19-Crunch は、ラット抗マウス CD19 抗体(1D3)の scFv を用いて設計された。シグナル配列(SS)、1D3 抗体の軽鎖可変領域(VL)、重鎖可変領域(VH)、mProS の EGF 様ドメイン(E)、SHBG 様ドメインおよび His タグ、FLAG タグ。

(B) scCD19-Crunch の予測構造。AlphaFold2 を用いて scCD19-Crunch の構造が予測された。

(C) Crunch の内在性標的。マウスから回収された脾細胞に対して scCD19-Crunch および抗マウス CD19-APC 抗体染色による結果を示す。

(D) scCD19-Crunch によるリン酸化誘導。MerTK 発現 NIH3T3 細胞は、無細胞(-)、BDKO 細胞、CD19 発現 BDKO 細胞と PBS または scCD19-Crunch(10 μ g/ml)の条件で共培養された。共培養後の NIH3T3 細胞のリン酸化 MerTK(pMerTK)、MerTK、 α -tubulin の WB 結果を示す。

(E-F) 内在性標的による貪食誘導。MerTK 発現 NIH3T3 細胞(E)またはマクロファージ(F)は、pHrodo-Red 標識脾細胞と PBS または scCD19-Crunch(10 μ g/ml)の条件で共培養された。共培養後の貪食陽性 NIH3T3 細胞の結果を示す(E)(平均 $\pm$ S.D., n=3)。また、共培養後マクロファージの pHrodo-Red レベルを示す(F)。数字は gating 内の細胞比率(貪食要請細胞の割合)を示す。Student unpaired *t* test(E). *** $P < 0.0001$ 。

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-5-2 Crunch におけるナノボディと scFv の性質

次に、ナノボディと scFv を用いた Crunch の性質を比較するため、GFP に対するマウスモノクローナル抗体(N86/38)(31)の scFv を用いて GFP 標的 scGFP-Crunch を設計した。scGFP-Crunch は GFPNb-Crunch と同程度のタンパク質熱安定性を示した(Figure.3-5-2A)。一方、scGFP-Crunch は ELISA においてより高い結合性を示し(Figure.3-5-2B)、標的細胞への結合性も GFPNb-Crunch より高いことが確認された(Figure.3-5-2C)。また、scGFP-Crunch の貪食細胞の貪食誘導効率は、結合性の高さに依存し、GFPNb-Crunch より優れていることが確認された(Figure.3-5-2D)。このことは、標的結合モジュールの標的分子結合性が Crunch の効果に影響することを示唆している。免疫原性について着目すると、scGFP-Crunch は GFPNb-Crunch と同様に、ProS モジュールでは免疫原性エピトープが増加しなかったが、scFv を含む標的結合モジュールではわずかに増加した (Figure.3-5-2E)。しかしながら、生体内免疫原性アッセイにおいて、scGFP-Crunch 投与マウスでは scGFP-Crunch に対する抗薬物抗体の産生が確認されなかった(Figure.3-5-2F)。この結果は、scFv を用いることで Crunch の標的結合モジュールに対する免疫原性を低下させることが可能なことを示唆している。

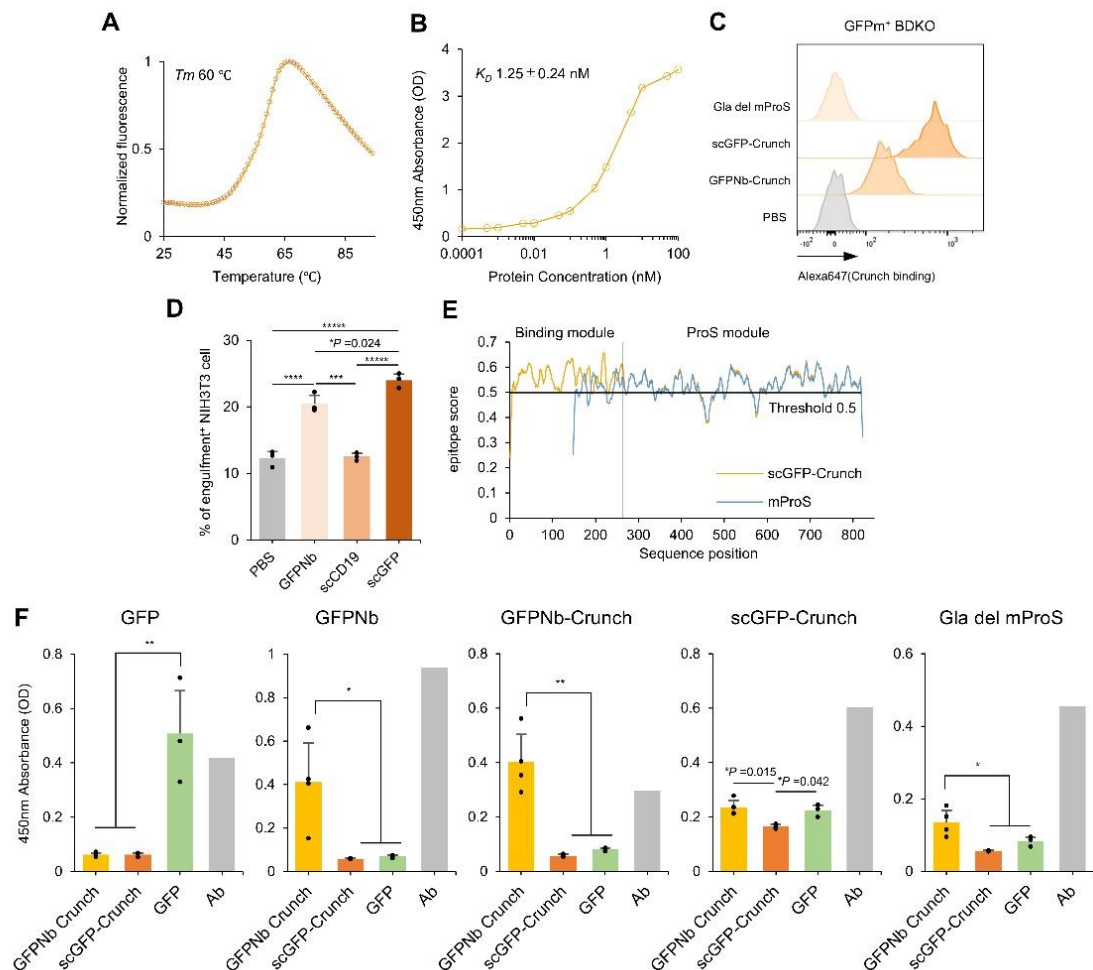


Figure.3-5-2: ナノボディと scFv を用いた Crunch の比較

(A) scGFP-Crunch の熱安定性。GFPNb-Crunch の熱安定性が DSF により測定された。3 回の技術的反復の各温度の平均および Tm を示す。

(B) scGFP-Crunch の結合親和性。scGFP-Crunch の結合親和性は GFP に対する ELISA により解析された。450 nm の吸光度および非線形回帰解析により推定された解離定数(Kd)を示す。

(C) 標的結合親和性比較。GFPm 発現 BDKO 細胞に対して PBS、GFPNb-Crunch、scGFP-Crunch、scCD19-Crunch(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で Crunch 結合アッセイをした結果を示す。

(D) 食食誘導能比較。標的細胞は pHrodo-標識 *Rosa26^{GFPm-OVA}* マウス由来胸腺細胞が用いられた。PBS、GFPNb-Crunch(GFPNb)、scGFP-Crunch(scGFP)、scCD19-Crunch(scCD19)により誘導された食食陽性 MerTK 発現 NIH3T3 細胞の割合を示す(5%FBS, 平均 $\pm$ SD, n=3)。

(E) scGFP-Crunch の B 細胞エピトープ。mProS と scGFP-Crunch の B 細胞エピトープスコアが BepiPred-2.0 により解析された。Threshold は 0.5 とした。

(F) scGFP-Crunch の ADA。scGFP-Crunch (150 μg)がマウスに静脈内投与され、投与 24 日後に血漿が回収された。血漿中の抗体は、His-GFP (GFP)、GFPNb-Crunch、GFPNb、scGFP-Crunch、Gla ドメイン欠損 mProS (Gla del mProS)に対しての ELISA で評価された。各タンパク質に対して行った ELISA の OD450 nm の値を示す(平均 $\pm$ SD, GFPNb-Crunch n=4, scGFP-Crunch n=3, GFP n=3)。GFPNb-Crunch と GFP の血漿は [Figure.3-4-2](#) で回収されたものが用いられた。GFP は mouse anti-GFP IgG2a antibody(100 ng/mL)、他のタンパク質は mouse anti-FLAG IgG1 antibody(100 ng/mL)が陽性コントロールとして用いられた。

one-way ANOVA with Tukey-Kramer *t* test(D-F). N.S. $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.00001$, ***** $P < 0.000001$.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-5-3 内在性分子標的 Crunch の生体内標的細胞除去

次に、Crunch による内在性分子を標的とした生体内標的細胞除去が可能か検証するため、scCD19-Crunch 投与による CD19 陽性 B 細胞除去モデルを考案した。scCD19-Crunch を WT マウスに腹腔投与し、投与 3 日後に血液および脾臓中リンパ球の解析を行った。その結果、CD19 および B220 陽性 B 細胞の減少が確認された(**Figure.3-5-3A**)。また、Crunch による標的特異性および投与経路による効果を評価するため、scCD19-Crunch および scGFP-Crunch を静脈内および腹腔内投与を行ったところ、scCD19-Crunch のみが B 細胞を減少させ、また投与経路の違いによる影響は見られなかった(**Figure.3-5-3B**)。

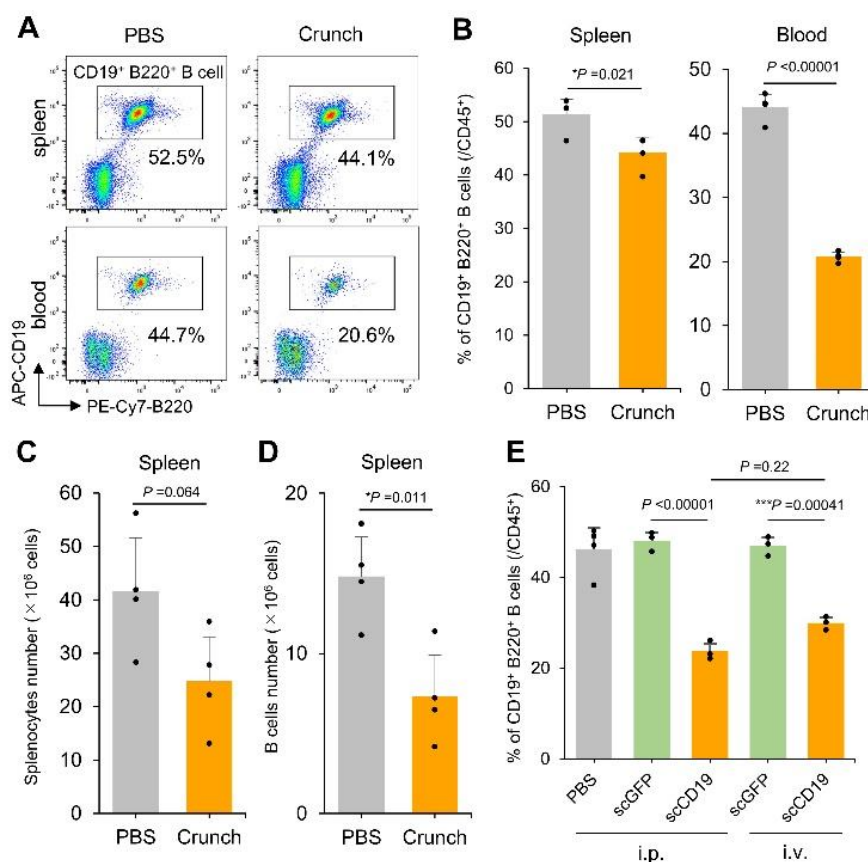


Figure.3-5-3: scCD19-Crunch による生体内 B 細胞除去

(A-D) 生体内 B 細胞除去モデル。WT マウスに対して PBS または scCD19-Crunch(100 μ g) が腹腔内投与され、投与 3 日後に脾細胞および血液細胞が回収された。各細胞の CD45 陽性細胞の CD19/B220 発現を(A)に示す。CD19 陽性 B220 陽性細胞(B 細胞)が gating された。(B)は CD45 陽性細胞のうち B 細胞の割合を示す。(C)は総脾細胞数を示し、(D)は脾臓中の B 細胞数を示す(平均 $\pm$ SD, n=3)。

(E) 投与経路による Crunch の作用。PBS または scGFP-Crunch、scCD19-Crunch(100 μ g) が腹腔内または静脈内投与され、投与 3 日後に血液細胞が回収された。CD45 陽性細胞のうち B 細胞の割合を示す(平均 $\pm$ SD, PBS n=4, 他サンプル n=3)。

one-way ANOVA with Tukey-Kramer *t* test(E). Student unpaired *t* test(B-D). N.S. *P*>0.05, **P*<0.05, ****P*<0.0001.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-5-4 Crunch と既存医薬品の比較

抗体は、標的分子の機能抑制や標的細胞の除去を目的とした医薬品として使われている。そこで、生体内標的細胞除去効果に着目し、Crunch と抗体の機能比較の比較実験を考案した。scCD19-Crunch の比較抗体として、同一エピトープを認識し、マウスモデルで B 細胞除去作用を示すことが知られている抗 mCD19 抗体(1D3)を利用した(47, 48)。はじめに、1D3 抗体の腹腔内投与を行い、B 細胞除去作用を評価した。その結果、CD19 陽性細胞は検出されなかったが、コントロールと同程度の B220 陽性細胞が検出された(Figure.3-5-4A)。これは、検出用抗体である抗 mCD19-APC 抗体のエピトープが 1D3 抗体結合によってマスクされた影響だと考えられ、実際に B220 陽性細胞には 1D3 抗体の結合が確認された(Figure.3-5-4B)。これらの結果から、以下では B220 陽性細胞を標的の B 細胞とみなし、解析を行った。100 μ g の scGFP-Crunch、scCD19-Crunch、1D3 抗体を腹腔内投与し、投与 1 日後から 7 日後まで毎日血液中リンパ球の解析を行った。その結果、scCD19-Crunch は投与 3 日後まで標的細胞である B 細胞を減少させたが、投与 4 日後から B 細胞の回復が確認された(Figure.3-5-4C)。一方、1D3 抗体は投与 5 日後まで B 細胞の減少が見られず、投与 6 日後にわずかな減少が確認された。これは、1D3 抗体が mCD19 を標的としたラット IgG2a 抗体であるためであると考えた。そこで、1D3 抗体の投与後に抗ラット κ 鎖マウス IgG2a 抗体を追加投与することで除去効果が増強されるか調べた。その結果、B 細胞除去作用がわずかに増強された(Figure.3-5-4D)。また、scCD19-Crunch の容量依存性を確認するため、0~300 μ g を腹腔内投与し、投与 1 日後から 7 日後まで毎日血液中リンパ球の解析を行った。その結果、scCD19-Crunch は容量依存的に B 細胞除去作用を示したが、投与 3 日後では 200 μ g で除去限界に達した(Figure.3-5-4D)。この除去限界は、Crunch の薬物動態の制限(半減期)か貪食システムの限界に依存するものだと考えられる。そこで、薬物動態の制限を回避するため、半減期である 12 時間ごとに 100 μ g の 3 回投与を行ったところ、300 μ g の単回投与より優れた B 細胞除去作用を示した(Figure.3-5-4D)。

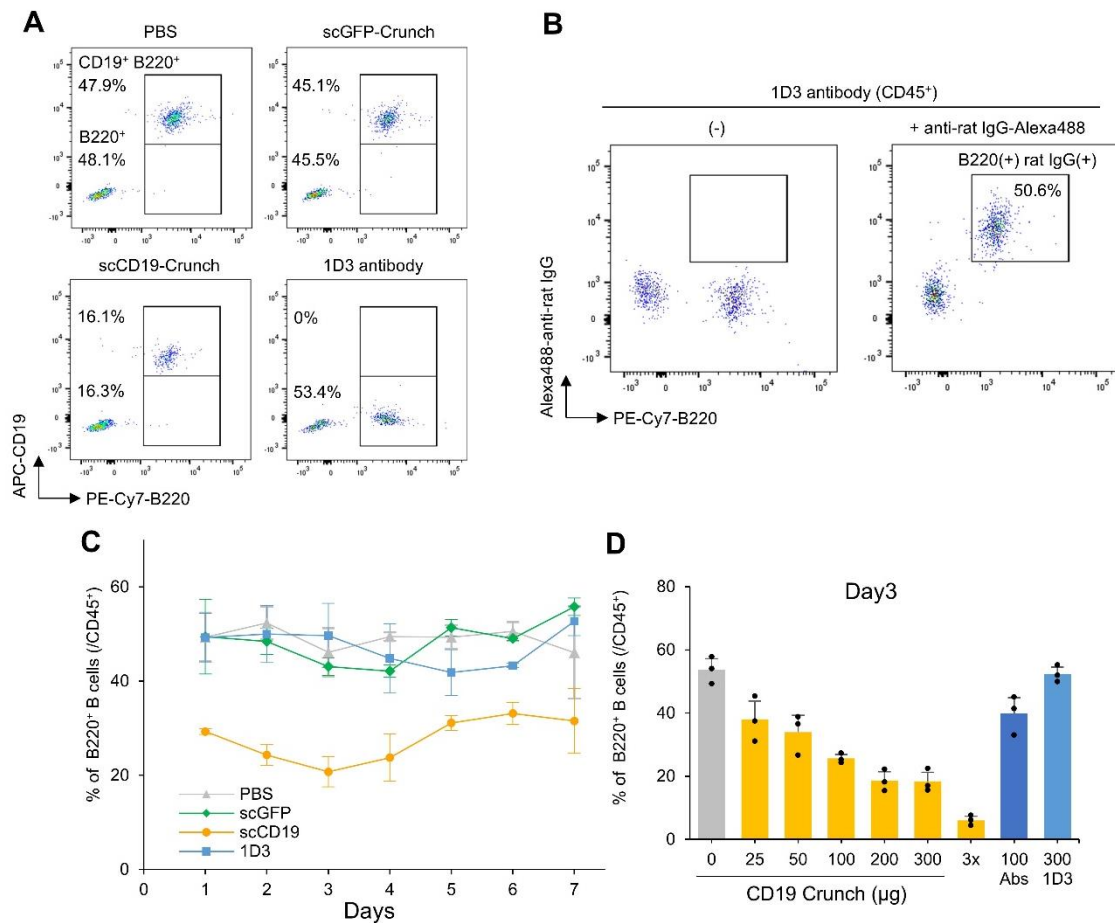


Figure.3-5-4: scCD19-Crunch と抗 CD19 抗体の比較

(A-C) Crunch と抗体の比較。WT マウスに対して PBS、scGFP-Crunch、ラット抗マウス CD19 抗体(1D3)、scCD19-Crunch(100 μg)が腹腔内投与され、投与 1 日後から 7 日後まで血液細胞が回収された。投与 3 日後の各細胞の CD45 陽性細胞の CD19/B220 発現を(A)に示す。投与 3 日後の 1D3 抗体投与マウス細胞の CD45 陽性細胞の anti-rat IgG/B220 染色の結果を(B)に示す。(C)は投与 1 日後から 7 日後までの CD45 陽性細胞のうち B220 陽性細胞(B 細胞)の割合を示す(平均±SD, n=3)。

(D) Crunch の容量依存性。WT マウスに対して scCD19-Crunch(0-300 μg の単回投与, 100 μg 12 時間ごとに 3 回反復投与)、抗ラット κ 鎖マウス IgG2a 抗体(Abs, 100 μg, 投与 24 時間前に 1D3 100 μg 投与)、1D3(300 μg)が腹腔内投与され、投与 1 日後から 7 日後まで血液細胞が回収された。CD45 陽性細胞のうち B 細胞の割合を示す(平均±SD, n=3)。

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-5-5 AAV を用いた Crunch システム

前項 3-5-4 から、Crunch の作用限界は半減期に影響を受けることが示唆された。そこで、アデノ随伴ウイルス(AAV)9 ベクターを用いた遺伝子治療的アプローチにより、持続的に Crunch を産生させる手法を考案した。AAV は先天性に凝固因子の欠乏が原因の血友病治療において、凝固因子をコードしたベクターを送達し、患者自身で凝固因子を持続的に産生させる治療法として承認されている(49, 50)。はじめに、項目 2-27 に記載されているように、AAV ベクターの改変を行い、scCD19-Crunch および tagRFP(コントロール)を AAV9 ベクターに搭載し、AAV9 ウイルスを作製した。これらの AAV9 ウイルスを WT マウスに静脈投与を行い、投与 14 日後に肝細胞および血液中リンパ球の解析を行った。その結果、tagRFP 搭載 AAV ウイルス投与マウスでは、肝細胞に tagRFP 発現細胞が確認され (Figure.3-5-5A)、scCD19-Crunch 搭載 AAV9 ウイルス投与マウスでは B 細胞除去効果が確認された (Figure.3-5-5B)。この B 細胞除去効果は投与 24 週間後までにわたり持続し、投与 24 週間後の血漿中で scCD19-Crunch が検出された (Figure.3-5-5C)。これらの結果から、Crunch の AAV ベクターを用いた遺伝子治療法への応用性が示された。

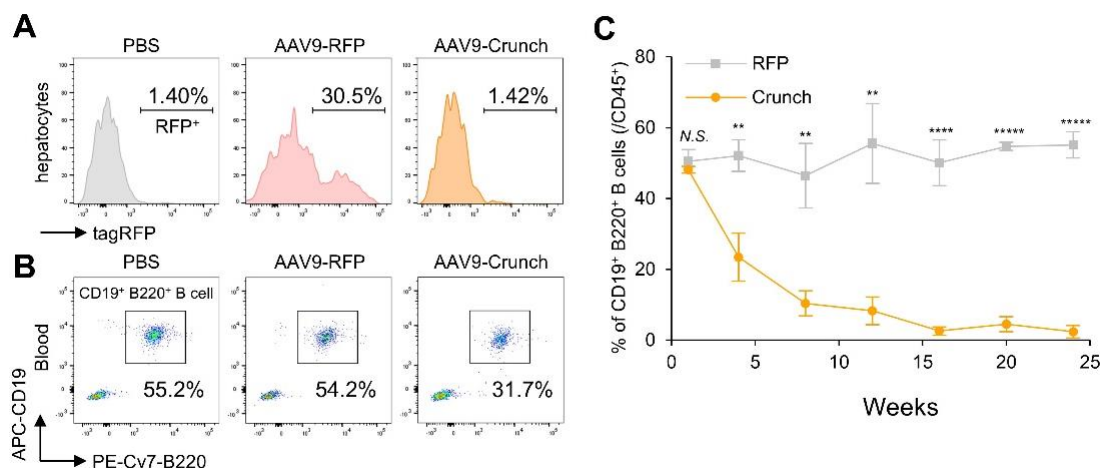


Figure.3-5-5: Crunch の AAV への適応

(A-B) AAV9 ウイルスの肝細胞感染。WT マウスに対して tagRFP または scCD19-Crunch をコードした AAV-EF1 ベクター搭載 AAV9 ウイルスが静脈内投与され、投与 2 週間後に肝細胞および血液細胞が回収された。肝細胞の tagRFP 発現レベル(A)および CD45 陽性血液細胞の B 細胞割合(B)を示す。

(C) AAV9-Crunch ウイルス作用。WT マウスに対して tagRFP または scCD19-Crunch をコードした AAV-EF1 ベクター搭載 AAV9 ウイルスが静脈内投与され、投与 1、4、8、12、16、20、24 週間後の血液細胞が回収された。各時点の CD45 陽性細胞のうち B 細胞の割合を示す(平均 ± SD, n=3-4)。Student unpaired *t* test(C). N.S. $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$, **** $P < 0.00001$, ***** $P < 0.000001$.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-5-6 Crunch の薬力学

医薬品は、治療戦略の最適化のために、その薬物が生体内でどの程度の濃度で作用するかを確認する薬力学試験が必要とされる。そのため、次に Crunch の薬力学的プロファイル、特に Crunch 血中濃度と作用(標的細胞除去)の検討を行った。Figure.3-5-4D で示した scCD19-Crunch の容量依存性実験から、scCD19-Crunch 投与マウスの B 細胞では、CD19 の平均蛍光強度(MFI)の減少が確認された(Figure.3-5-6A)。これは、血中 scCD19-Crunch が B 細胞上の CD19 に結合し、抗 CD19-APC 抗体検出が阻害された影響だと考えられる。すなわち、B 細胞への scCD19-Crunch 結合量を CD19MFI の減少から推測することができる。同実験において、B 細胞除去率(前日比)と CD19MFI(B 細胞への Crunch 結合と逆相関)をプロット化すると、ある一定以下の CD19MFI(コントロール比 0.7~0.8 程度)では Crunch の B 細胞除去作用が見られるのに対し、それ以上の CD19MFI では作用が見られず、B 細胞の回復が見られた(Figure.3-5-6B)。これは、scCD19-Crunch の B 細胞結合がある一定量以下になると、B 細胞除去作用が失われることを示唆する。

一般に、血中で標的へのタンパク質結合は血中濃度と相関するため、B 細胞への scCD19-Crunch 結合は血中 scCD19-Crunch 濃度と相関する。そのため、Figure.3-5-6B の結果から scCD19-Crunch の B 細胞除去作用限界である最低血中薬効濃度は投与後 1 日後から 2 日後から求めることができると考えた。より具体的な Crunch の最低血中薬効濃度を求めるため、100 µg の scCD19-Crunch 腹腔投与 1 日後の血漿中 Crunch 濃度を測定したところ、 71.5 ± 7.3 ng/mL であった(Figure.3-5-6C,D)。また、項目 3-5-5 の AAV ウイルス投与 24 週間後の血漿中 Crunch 濃度を測定したところ、91.2~572.3 ng/mL であり、B 細胞除去効率は血漿中 Crunch 濃度と相関がみられ、特に 91.2 ng/mL のマウスでは B 細胞の回復傾向が見られた(Figure.3-5-6E,F)。これらの結果から、Crunch による標的細胞除去作用には、50~100 ng/mL (0.5~1 nM)の血中濃度が要求されることが推察された。

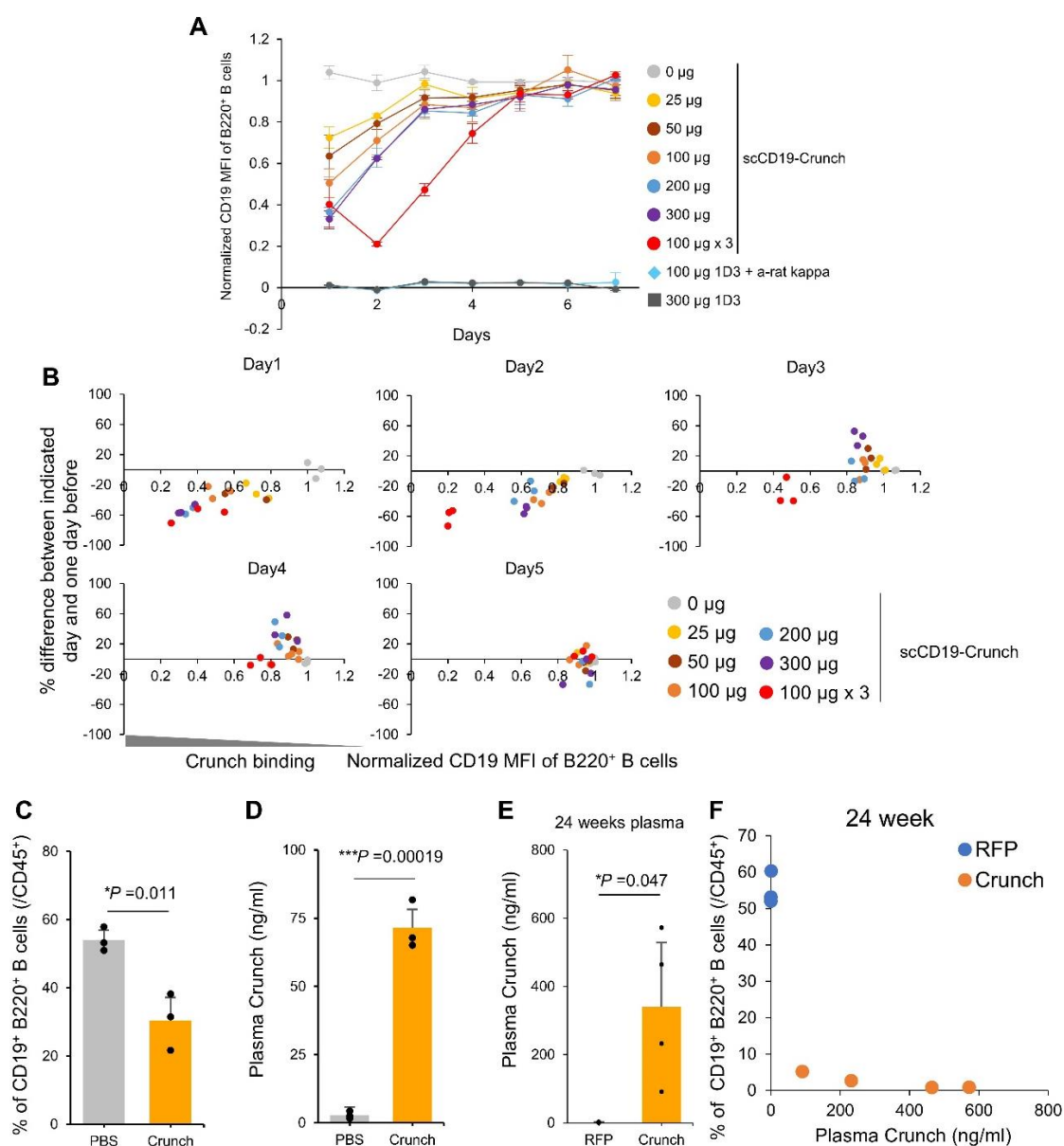


Figure.3-5-6: Crunch の薬力学検証

(A-B) 血漿 Crunch 濃度と作用相関。Figure.3-5-4D の B220 陽性 B 細胞の正規化 CD19MFI 時間推移を示す(A)(平均±S.D., n=3)。各時間における B 細胞の正規化 CD19MFI(Crunch 結合と逆相関)と前日との CD45 陽性細胞のうち B 細胞の割合の前日との差(0 日目は 55%とする)の相関を示す(B)(n=3 マウス)。

(C-D) Crunch の最低薬効濃度。WT マウスに対して scCD19-Crunch(100 µg)が腹腔内投与され、投与 1 日後に血液細胞と血漿が回収された。CD45 陽性細胞のうち B 細胞の割合を示す(C)(平均±S.D., n=3)。血漿 scCD19-Crunch 濃度を示す(D)(平均±SD, n=3)。

(E-F) AAV9-Crunch ウイルス最低薬効濃度。Figure.3-5-5C のウイルス投与 24 週間後の血漿 scCD19-Crunch 濃度を示す(E) (平均±SD, n=3-4)。CD45 陽性細胞のうち B 細胞の割合と血漿 scCD19-Crunch 濃度の相関を示す(F)。

Student unpaired *t* test(C-E).N.S. *P*>0.05, **P*<0.05, ****P*<0.001.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-6 内在性分子を標的化した治療戦略

3-6-1 Crunch による TYRP1 を標的としたメラノーマ治療

前項 3-5 までに行ってきた実証実験から、Crunch がナノボディおよび scFv を利用することで内在性分子を標的化し、標的細胞除去作用を持つことが示された。最後に、マウス疾患モデルにおいて内在性分子を標的化、治療を行う Crunch 治療戦略の実証実験を行った。TYRP1 分子は、メラニン産生に関わるタンパク質であり、メラノーマの表面マーカーとして診断に使われる分子である(51)。この TYRP1 を標的化するために、ヒト抗 TYRP1 抗体(20D7S、Flanvotumab(32))の配列に基づいて TYRP1 に対する scFv および scTYRP1-Crunch を設計した(Figure.3-6-1A)。この scTYRP1-Crunch は、抗 TYRP1 抗体と同様に B16F10 への結合が確認された(Figure.3-6-1B)。項目 3-3-2 で行った実験と同様に、B16F10 細胞を WT マウス後肢に皮下注入を行い、腫瘍サイズが 4 mm³ に到達する移植 7 日目から 2 日ごとに計 3 回の scTYRP1-Crunch 投与を行った。その結果、scTYRP1-Crunch 治療は腫瘍の増殖を抑制し、エンドポイントにおける腫瘍重量の減少も確認された(Figure.3-6-1C-F)。また、scTYRP1-Crunch 治療によるマウス体重への影響は見られなかった(Figure.3-6-1G)。

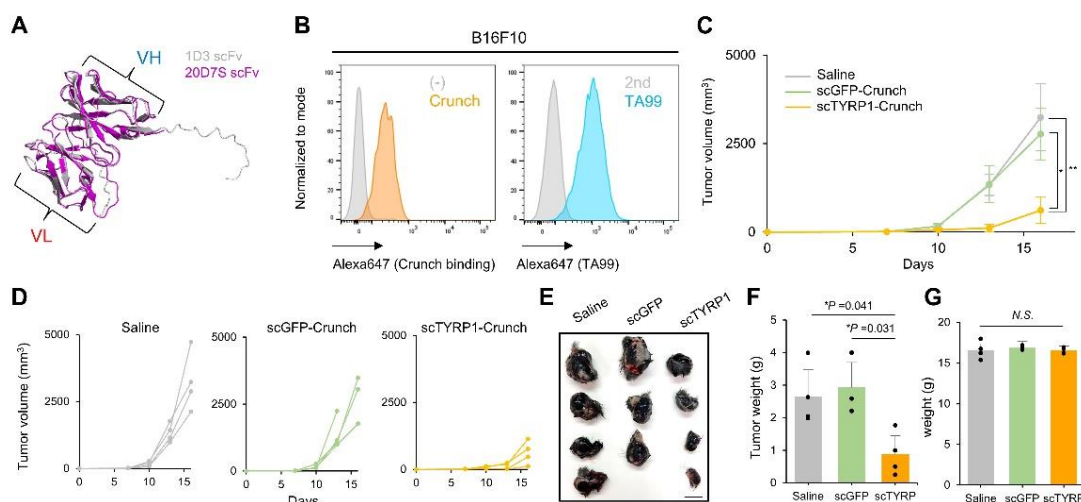


Figure.3-6-1: TYRP1 を標的とした Crunch 治療

(A) 抗 TYRP1 scFv の予測構造。AlphaFold2 を用いて 1D3 scFv および抗 TYRP1 抗体(20D7S) scFv の構造が予測され、比較された。

(B) scTYRP1-Crunch の B16F10 結合。B16F10 細胞に対し scTYRP1-Crunch の結合アッセイ(左)および抗 TYRP1 抗体(TA99)による染色が行われた結果を示す。

(C-G) B16F10 移植マウスに対する抗 TYRP1-Crunch 治療。B16F10 細胞が Figure. 3-3-2-1 と同様に WT マウスに移植され、Saline および scGFP-Crunch、scTYRP1-Crunch(100 µg)で治療された。腫瘍移植 7 日後から 3 日間ごとに測定された腫瘍サイズを示し、(C)は平均値、(D)は各マウスの値を示す。(E)は実験終了時に摘出された腫瘍の写真を示す。実験終了時の腫瘍サイズ(E)とマウス体重(G)を示す(平均±SD, Saline n=4 マウス, scGFP-Crunch n=3 マウス, scTYRP1-Crunch n=4 マウス)。one-way ANOVA with Tukey-Kramer *t* test(C,F-G). N.S. *P*>0.05, **P*<0.05, ***P*<0.01。

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

3-6-2 Crunch による CD19 を標的とした全身性エリテマトーデス(SLE)治療

次に、SLE への Crunch の治療効果を検証した(5, 52)。先行研究では、B 細胞の減少が SLE に対して治療効果を持つことが報告されている(53, 54)。そこで、自然発症型 SLE マウスモデルである MRL^{lpr/lpr} マウスに対して scCD19-Crunch 腹腔内投与治療を行うことで、Crunch による SLE 治療実証実験を行った。Crunch 治療は 8 週齢から開始し、13 週齢までの 5 週間、週 2 回の 150 µg 投与を継続して実施された(Figure.3-6-2A)。その結果、治療終了時において、scCD19-Crunch 治療マウスでは、脾臓および血液中の B 細胞が減少した(Figure.3-6-2B-D)。一方で、scCD19-Crunch 投与はマウスの体重や脾臓重量には影響を与えなかった(Figure.3-6-2E)。SLE の診断として確認される腎臓に着目すると、H&E 染色により、scCD19-Crunch 治療群のマウス腎臓において糸球体腎炎およびリンパ球浸潤が抑制されていたことが確認された(Figure.3-6-2F,G)。また、コントロール群の糸球体では SLE の所見である IgG 沈着が確認されたが、scCD19-Crunch 治療群の糸球体では IgG 沈着が抑制されていた(Figure.3-6-2H,I)。加えて、尿中タンパク質/クレアチニン比も scCD19-Crunch 治療群で正常レベルであることが確認され、scCD19-Crunch 治療は SLE モデルマウスの腎機能を保護していることが示された(Figure.3-6-2J)。加えて、SLE の重要な所見である自己抗体産生に着目すると、抗核抗体(ANA)および抗 dsDNA(anti-dsDNA)抗体の血中濃度が、scCD19-Crunch 治療によって減少していることが確認された(Figure.3-6-2K,L)。これらの結果は、Crunch 治療が SLE に対して治療効果を持つことを示している。

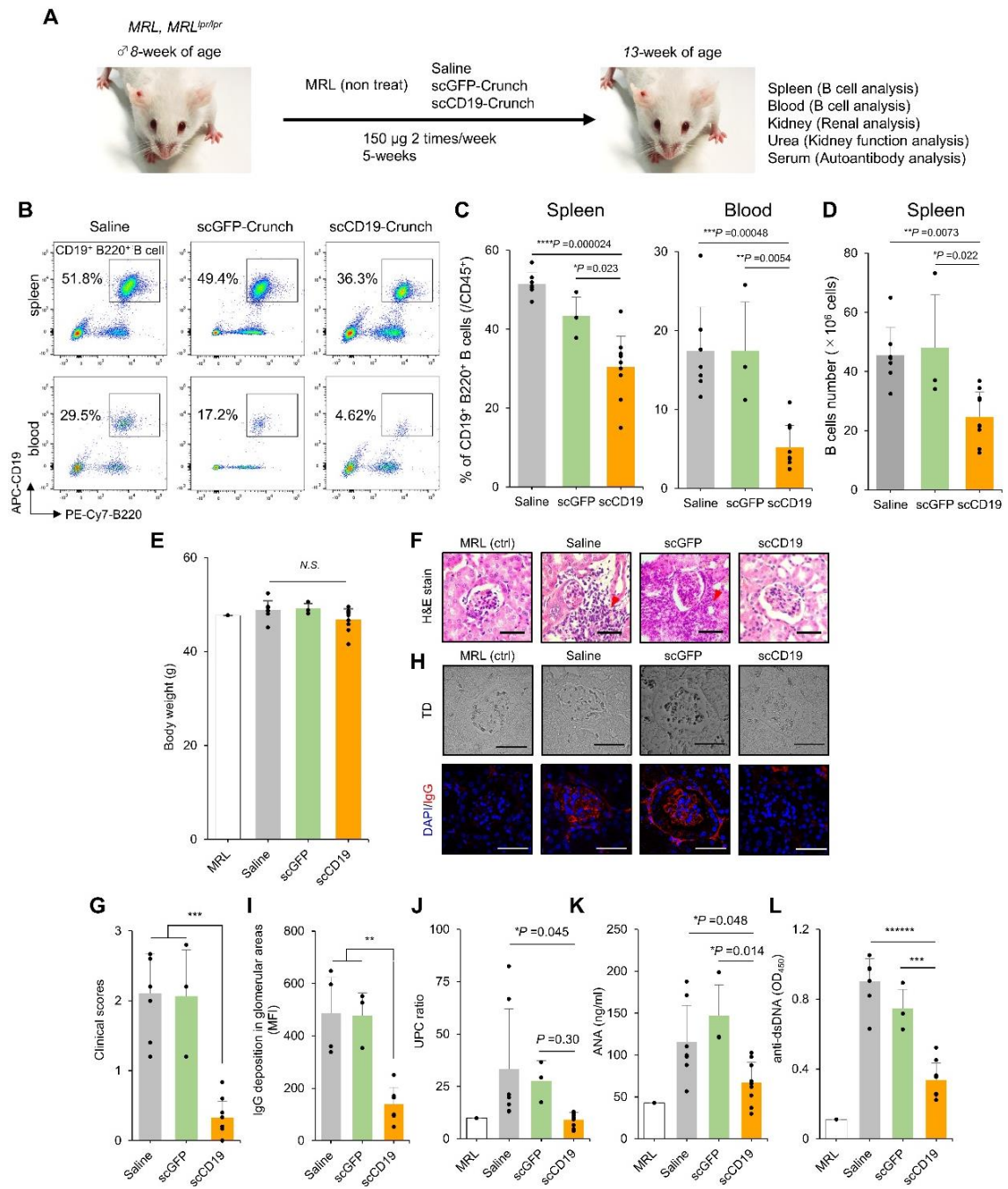


Figure.3-6-2: SLE に対する Crunch 治療

(A) SLE モデルに対する Crunch 治療の概略図。8 週齢の MRL^{lpr/lpr} マウス (SLE モデル) に対して、Saline、scGFP-Crunch、scCD19-Crunch (150 μ g) が週 2 回、13 週齢まで 5 週間腹腔内投与され、Crunch 治療が行われた。B 細胞解析のため脾細胞と血液細胞、腎解析のため腎臓、腎機能解析のため尿、自己抗体解析のため血清が回収された。

(B-D) B 細胞解析。回収された脾細胞(B)および血液細胞(C)中の CD45 陽性細胞のうち、B 細胞の割合を示す。(D)は脾臓中の B 細胞数を示す(平均 $\pm$ SD, Saline n=7 マウス, scGFP-Crunch n=3 マウス, scCD19-Crunch n=9 マウス)。

(E) Crunch 治療による体重変化。実験終了時のマウス体重を示す(平均 $\pm$ SD, MRL[健常マウス] n=1, Saline n=7 マウス, scGFP-Crunch n=3 マウス, scCD19-Crunch n=9 マウス)。

(F-I) 腎解析。実験終了時に回収された腎臓は、10%中性緩衝ホルマリン液を用いて 4°Cで一晩固定され、パラフィンに包埋された。4 μ m で薄切された腎臓切片は、H&E 染色(F)または Alexa647 標識抗マウス IgG 抗体および DAPI で染色された(H)。図は代表的な腎糸球体領域を示す。(G)は H&E 染色の結果をもとに、各マウス 5-6 個の腎糸球体が 0-3 で半定量化された腎組織スコアの平均値を示す(平均 $\pm$ SD, Saline n=7 マウス, scGFP-Crunch n=3 マウス, scCD19-Crunch n=9 マウス)。(I)は免疫染色の結果をもとに、腎糸球体領域の Alexa647MFI を示す(平均 $\pm$ SD, Saline n=4 マウス, scGFP-Crunch n=3 マウス, scCD19-Crunch n=6 マウス)。

(J) 腎機能解析。腎機能解析は、尿中のタンパク質/クレアチニン比(UPC ratio)で測定された(平均 $\pm$ SD, MRL[健常マウス] n=1, Saline n=7 マウス, scGFP-Crunch n=3 マウス, scCD19-Crunch n=9 マウス)。

(K-L) 自己抗体。血清中の自己抗体は、抗核抗体(ANA)と抗 dsDNA 抗体(anti-dsDNA antibody)が ELISA により測定された。(K)は血清 ANA 濃度を示す。(L)は ELSIA での OD450 を示す(平均 $\pm$ SD, MRL[健常マウス] n=1, Saline n=7 マウス, scGFP-Crunch n=3 マウス, scCD19-Crunch n=9 マウス)。

one-way ANOVA with Tukey-Kramer *t* test(C-E,G-L). N.S. $P>0.05$, * $P<0.05$ ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ***** $P<0.000001$.

(Yamato et al. 2025. Nature Biomedical Engineering を改変)

第4章 考察

4-1 Crunch の臨床的意義

本研究では、新規モダリティ Crunch の生産技術の確立、ナノボディや scFv への設計可変性の確認、内在性分子標的治療の実証、薬物動態、安全性試験の実施、ヒト応用性の評価を行った。これらの実施は、抗体の標的化能力を利用した新たな治療プラットフォーム Crunch システムの初期開発を成し遂げたものである。Crunch は、生体が保有する毎日数千億もの細胞を処理する死細胞貪食機構と抗体の優れた標的化能力を利用して、標的細胞の貪食による生体内除去を誘導する画期的なモダリティであり、臨床治療に新たな選択を提供すると考えられる。しかしながら、Crunch の臨床応用にはいくつかの技術的課題を解決する必要があるだろう。

4-2 Crunch の技術的課題

4-2-1 生産技術の向上

遺伝子組み換え技術などのバイオテクノロジーを用いたバイオ医薬品は、低分子医薬品とは異なり、原薬製造に培養細胞を用いることが多く、製造コストは低分子医薬品よりも高価となる。そのため、バイオ医薬品の生産効率は重要視される。生産技術の観点で、本研究では、**項目 2-6** および **Figure.3-1-2** で Crunch のタンパク質生産および精製技術の確立が行われた。特に、培養上清からの精製技術問題が培養上清中のヒスチジンと推測し、pH に着目することで精製効率 100%近い技術を新たに確立したことは、実験レベルの精製技術に新たな知見を与えるものである。また、タンパク質高発現細胞株を樹立するための”Repeat Infection-Sorting”法は、クローニングの必要がなく、短期間で高発現細胞を樹立することができ、精製技術と合わせて約 9.6 mg/L の Crunch タンパク質生産を成し遂げた。これは、現在医薬品として上市されている一本鎖二重特異性抗体 Blinatumomab の初期開発時点の生産量 4mg/L の約 2.4 倍である(12)。一方で、似たような CHO システムを用いて実験レベルで生産される抗体の生産量は 100 mg/L であり、Crunch と比べて極めて高い(55)。これは、改変した非天然タンパク質を用いていることが理由としてあげられる。近年の抗体医薬品では、抗体医薬の製造原価を圧縮するため、遺伝子工学の発達や細胞株の改良、培養技術の向上が行われることにより生産量が 10g/L にまで達している(56, 57)。Crunch の生産技術には一定の懸念が残るものの、近年の組み換えタンパク質大量生産技術を取り込むことで生産技術的課題は克服されると考える。

4-2-2 生体内半減期

医薬品の薬物動態は、薬物作用に極めて重要な影響を及ぼす。薬物動態の中でも、静脈投与されることが多いバイオ医薬品は、薬物の分布、代謝、排泄、すなわち生体内半減期の及

ばす影響がほとんどを占める。本研究では、Crunch の生体内半減期が **Figure.3-4-1** で検証され、静脈内投与で 11.4 時間、腹腔内投与で 15.0 時間と算出された。これは、一般的に半減期が短いサイトカイン医薬品(数分~)や、一本鎖二重特異性抗体(0.6 時間)よりは長いものの、抗体や二重特異性抗体(6-8 日間)より極めて短い(34, 58, 59)。バイオ医薬品の生体内クリアランスは、腎糸球体濾過、血中代謝(分解)、標的/非標的組織への取り込みで考えることができ、Crunch タンパク質は 75-100kDa であるため、腎糸球体濾過を回避可能であるが、抗体における FcRn(60, 61)のようなエンドサイトーシス後のリサイクリングシステムを持たないため、細胞に取り込まれ分解されている結果、約 12 時間程度の生体内半減期になったと考えられる。

しかしながら、薬物動態の考え方において生体内半減期は長ければよい、短ければ悪いというものではない。例えば、睡眠薬の生体内半減期は、薬物消失が約 6 時間から 8 時間になるようにされており、それよりも極めて長ければ接種者は起きることが難しくなる。このように、生体内半減期は薬物作用目的に適応したものである必要がある。実際に、抗体の半減期は極めて長いため、IL-6 阻害薬 Tocilizumab は免疫抑制効果を示すが、長期的な免疫抑制を行われることで重篤な感染症リスクが生じるなどの副作用が生じる(62)。Crunch の例では、生体内半減期がそれほど長くないため、長期的な標的細胞の除去を行うことがリスクになる疾患に対して用いることができる。

一方で、**Figure.3-5-4** で行ったように、目的によっては生体内半減期の短さによる作用限界が生じるため、生体内半減期を技術的に解決することは、Crunch の治療応用性の幅を広げることになる。例えば、**Figure.3-5-5** で実施した AAV9 ウイルスを用いて生体内で持続的に Crunch を産生させるアプローチなどがそれにあたる。また、**Figure.3-4-1** の結果は、静脈内投与より腹腔内投与の方が長い生体内半減期を示した。実際に、最高血漿濃度は静脈内の方が高いが、48 時間後からは腹腔内投与の方が血漿濃度は高くなっている。これは、腹腔内からの吸収が遅く、持続的に血中へ吸収されたことによる結果だと考えられる。臨床的には皮下投与が似た性質を示しており、**Figure.3-5-6** の結果より Crunch の最低薬効濃度が低いことから投与方法の変更によるアプローチもあげられる。また、サイトカイン医薬品は非常に半減期が短いため、何度も投与する必要があったが、抗体の Fc 領域を付加することや PEG を結合させることで生体内半減期を延長するアプローチがされてきた(63, 64)。これらのアプローチを Crunch に応用することで、生体内半減期を延長し、薬物作用を増強させることが可能となるだろう。

4-2-3 安全性

医薬品において最も重要視されるのは安全性である。医薬品のベネフィットと安全性リスクの兼ね合いは疾患によって異なるが、安全性が高い医薬品ほど適応範囲は広がる。Crunch の安全性は **Figure.3-4-2** および **Figure.3-5-2** で検証され、自然免疫応答リスクは

少ないが、バイオ医薬品で重要視される免疫原性リスクが示唆された。Crunch の ProS モジュールは天然由来の配列であり、ナノボディや scFv を結合したことによる T 細胞/B 細胞の免疫原性は見られなかったが、標的結合モジュール、特にナノボディは強い B 細胞免疫原性を示した。ナノボディは凝集体が B 細胞の抗体産生を引き起こすことが知られており(65, 66)、本研究で用いた Crunch は凝集体を除去するステップが行われていないため生じたものであると考えられる。一方で、マウス由来の scFv を用いた Crunch では抗体産生がされなかったため、治療対象と同じ由来のタンパク質を用いることで免疫原性リスクを減らすことが可能だと考えられる。しかしながら、本研究では、GFP に対するナノボディと scFv の 1 例で確認したのみであるため、安全性について今後追及していく必要がある。

4-2-4 エフェクター細胞

Crunch はモダリティ単体で機能せず、エフェクター細胞である貪食細胞を介して標的細胞を除去する。そのため、Crunch の機能は貪食細胞に依存する。例えば、Figure.3-3-2-2 で行われた肺転移モデルでは Figure.3-3-2-1 の皮下接種モデルと比較して薬物作用が低いと見ることができる。これは、関与する貪食細胞の違いに依存するもので、皮下接種モデルでは Figure.3-3-2-2 に示すように MerTK 発現マクロファージが Crunch による貪食細胞として機能する。肺転移モデルでは、肺に常在するマクロファージは炎症性マクロファージが多く、炎症性マクロファージは MerTK の発現レベルが低下するため(67, 68)、Crunch による貪食細胞としての機能が皮下接種モデルと比較して弱かったからだと考えられる。このことは、Crunch のエフェクター細胞が少ない臓器では Crunch の薬物作用が低下することを示唆する。この問題を解決するため、細胞情報に基づいた標的組織の決定もしくは、併用療法による標的組織へのマクロファージ動員が必要になってくるだろう。

4-3 Crunch の展望

4-3-1 治療プラットフォーム

Crunch の利点は、モジュール化された設計システムによる、標的の可変性、すなわち治療プラットフォーム化されているところにある。Crunch は、薬物作用に必須な共通部分である ProS モジュールと、自由に変更可能な標的結合モジュールにより構成されており、本研究では、ナノボディと抗体由来の scFv が使用され、そのモジュール性が示された。そのため、新たな治療標的を選択するには標的結合モジュールを変更するだけでよく、治療プラットフォームとして利用することが可能となっている。また、標的結合モジュールはナノボディや scFv に縛られることはなく、遺伝子工学的、合成化学的に結合または付加が可能であればタンパク質ドメインや中分子ペプチド環(69)、低分子化合物、RNA、AI で結合予測されたペプチド(70, 71)など、これまでそしてこれから生み出される多種多様なモダリティ

との組み合わせが可能になると考えられる。

4-3-2 既存医薬品との比較

項目 1-2 で述べたように、抗体による標的化は ADCC や CDC による殺傷能力の限界から、ADC や二重特異性抗体などのように、抗体の標的化機能に新たな機能を付加するアプローチが行われてきた。本研究で開発を行った Crunch は、抗体の標的化機能に、生体内で恒常的に行われている死細胞貪食を利用する機能を付加したものとなっている。抗体の標的化に関与する Fc 受容体を発現したエフェクター細胞が血球細胞に限定されていることに対して(72)、死細胞貪食機構(Crunch)のエフェクター細胞は多岐にわたるかつ、恒常的に大量の細胞を除去しているため(1)、抗体より強力な標的細胞除去が可能になると考えられる。実際に、Figure.3-5-4D で示した CD19 標的 B 細胞除去効率は、scCD19-Crunch が抗 CD19 抗体を上回る結果となっている。一方で、薬物動態や安全性まで考慮した Crunch と抗体の比較、また ADC や二重特異性抗体との有効性評価も今後行っていく必要がある。

4-3-3 実験ツールとしての Crunch

マウス実験系において、特定の細胞集団を除去し、特定の細胞枯渇実験を行うために、B 細胞の CD19 や T 細胞の CD3 といった細胞特異的な表面マーカーに対する抗体(47, 48, 73)が使われている。抗体によって細胞除去を行うためには、例えば本研究で用いた抗 CD19 抗体(1D3)だと、B 細胞を除去するために 300 µg の抗 CD19 抗体と 300 µg の抗 B220 抗体を実験 3 週間前に投与し、実験中も 5 日おきに投与し続ける必要がある(48)。そのため、Figure.3-5-4 で示したように、短期で B 細胞除去を行うことは難しいとされる。一方で、scCD19-Crunch は Figure.3-5-4D で示したように複数回投与により B 細胞を極めて迅速に除去することができた。また、タンパク質投与と Figure.3-5-5 の AAV を用いた生体内 Crunch 発現で、迅速かつ長期的な細胞枯渇モデルマウスを作ることが可能だと考えられる。本研究で開発された Crunch は、治療目的だけでなく、実験ツールとしての有望性も期待される。

4-3-4 高度な標的化

これまでの低分子医薬品、抗体をはじめとしたバイオ医薬品は特定の一つの標的分子を標的化してきた。このアプローチでは、標的分子が限られており、実際に抗体医薬品はその標的分子が欠乏しつつある。がん細胞が発現する分子は多数あるものの、通常細胞と区別できないため標的化することが不可能であり、既に知られている過剰発現タンパク質はほぼ標的化済みとなっている。そのため、抗体の標的化を利用した ADC や二重特異性抗体などのアプローチがなされてきたが、これらは特定の一つの標的分子を効率的に標的化する手

法となっている。これは、抗体が非常に優れており、一つの分子で機能することに由来する。一方で、Crunch が機能するためには [Figure.1-1](#) や [Figure.3-2-2](#) で示したように二つの分子が MerTK を二量体化する必要がある。ここに遺伝子工学的な介入の余地があり、ホモダイマーで機能する Crunch を、ヘテロダイマーでのみしか機能しない改変を加えることで、二つの標的分子を認識したときのみ作用するようにできる。この Crunch による高度な標的化が可能となれば、例えば、がん細胞と通常細胞の両方が発現している標的分子 A と、そのがん細胞と他の通常細胞の両方が発現している標的分子 B の二つの標的分子を標的化することで、がん細胞のみを標的化するなどといった従来の抗体では成し遂げられなかったアプローチが可能となる。Crunch による高度な標的化は、従来の抗体では限りのあった標的分子の拡大をすることが可能となるだろう。

文献

1. S. Arandjelovic, K. S. Ravichandran, Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol* **16**, 907–917 (2015).
2. J. Suzuki, D. P. Denning, E. Imanishi, H. R. Horvitz, S. Nagata, Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science* **341**, 403–406 (2013).
3. S. Nagata, M. Tanaka, Programmed cell death and the immune system. *Nat Rev Immunol* **17**, 333–340 (2017).
4. T. Soussi, K. G. Wiman, Shaping Genetic Alterations in Human Cancer: The p53 Mutation Paradigm. *Cancer Cell* **12**, 303–312 (2007).
5. A. Rahman, D. A. Isenberg, Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **358**, 929–939 (2008).
6. J. S. Smolen, D. Aletaha, A. Barton, G. R. Burmester, P. Emery, G. S. Firestein, A. Kavanaugh, I. B. McInnes, D. H. Solomon, V. Strand, K. Yamamoto, Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 1–23 (2018).
7. M. G. Kris, B. E. Johnson, L. D. Berry, D. J. Kwiatkowski, A. J. Iafrate, I. I. Wistuba, M. Varella-Garcia, W. A. Franklin, S. L. Aronson, P.-F. Su, Y. Shyr, D. R. Camidge, L. V. Sequist, B. S. Glisson, F. R. Khuri, E. B. Garon, W. Pao, C. Rudin, J. Schiller, E. B. Haura, M. Socinski, K. Shirai, H. Chen, G. Giaccone, M. Ladanyi, K. Kugler, J. D. Minna, P. A. Bunn, Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs. *JAMA* **311**, 1998–2006 (2014).
8. M. Leidi, E. Gotti, L. Bologna, E. Miranda, M. Rimoldi, A. Sica, M. Roncalli, G. A. Palumbo, M. Introna, J. Golay, M2 Macrophages Phagocytose Rituximab-Opsonized Leukemic Targets More Efficiently than M1 Cells In Vitro¹. *The Journal of Immunology* **182**, 4415–4422 (2009).
9. Y. Shi, X. Fan, H. Deng, R. J. Brezski, M. Ryczyn, R. E. Jordan, W. R. Strohl, Q. Zou, N. Zhang, Z. An, Trastuzumab Triggers Phagocytic Killing of High HER2 Cancer Cells In Vitro and In Vivo by Interaction with Fc γ Receptors on Macrophages. *The Journal of Immunology* **194**, 4379–4386 (2015).
10. Z. Fu, S. Li, S. Han, C. Shi, Y. Zhang, Antibody drug conjugate: the “biological

- missile” for targeted cancer therapy. *Sig Transduct Target Ther* **7**, 1–25 (2022).
11. K. Tsuchikama, Y. Anami, S. Y. Y. Ha, C. M. Yamazaki, Exploring the next generation of antibody–drug conjugates. *Nat Rev Clin Oncol* **21**, 203–223 (2024).
 12. A. Löffler, P. Kufer, R. Lutterbüse, F. Zettl, P. T. Daniel, J. M. Schwenkenbecher, G. Riethmüller, B. Dörken, R. C. Bargou, A recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 × CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood* **95**, 2098–2103 (2000).
 13. T. Dreier, G. Lorenczewski, C. Brandl, P. Hoffmann, U. Syring, F. Hanakam, P. Kufer, G. Riethmüller, R. Bargou, P. A. Baeuerle, Extremely potent, rapid and costimulation-independent cytotoxic T-cell response against lymphoma cells catalyzed by a single-chain bispecific antibody. *International Journal of Cancer* **100**, 690–697 (2002).
 14. S. S. Hosseini, S. Khalili, B. Baradaran, N. Bidar, M.-A. Shahbazi, J. Mosafer, M. Hashemzaei, A. Mokhtarzadeh, M. R. Hamblin, Bispecific monoclonal antibodies for targeted immunotherapy of solid tumors: Recent advances and clinical trials. *International Journal of Biological Macromolecules* **167**, 1030–1047 (2021).
 15. J. S. Huston, D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M. S. Tai, J. Novotný, M. N. Margolies, R. J. Ridge, R. E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea, Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 5879–5883 (1988).
 16. J. N. Brudno, J. N. Kochenderfer, Current understanding and management of CAR T cell-associated toxicities. *Nat Rev Clin Oncol* **21**, 501–521 (2024).
 17. D. J. Baker, Z. Arany, J. A. Baur, J. A. Epstein, C. H. June, CAR T therapy beyond cancer: the evolution of a living drug. *Nature* **619**, 707–715 (2023).
 18. S. Hafizi, B. Dahlbäck, Gas6 and protein S. *The FEBS Journal* **273**, 5231–5244 (2006).
 19. C. Lai, G. Lemke, An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron* **6**, 691–704 (1991).
 20. D. K. Graham, T. L. Dawson, D. L. Mullaney, H. R. Snodgrass, H. S. Earp, Cloning

- and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ* **5**, 647–657 (1994).
21. J. H. M. van der Meer, T. van der Poll, C. van 't Veer, TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood* **123**, 2460–2469 (2014).
 22. M. Klichinsky, M. Ruella, O. Shestova, X. M. Lu, A. Best, M. Zeeman, M. Schmierer, K. Gabrusiewicz, N. R. Anderson, N. E. Petty, K. D. Cummins, F. Shen, X. Shan, K. Veliz, K. Blouch, Y. Yashiro-Ohtani, S. S. Kenderian, M. Y. Kim, R. S. O'Connor, S. R. Wallace, M. S. Kozlowski, D. M. Marchione, M. Shestov, B. A. Garcia, C. H. June, S. Gill, Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol* **38**, 947–953 (2020).
 23. J. Suzuki, M. Umeda, P. J. Sims, S. Nagata, Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* **468**, 834–838 (2010).
 24. M. Maruoka, P. Zhang, H. Mori, E. Imanishi, D. M. Packwood, H. Harada, H. Kosako, J. Suzuki, Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane. *Molecular Cell* **81**, 1397-1410.e9 (2021).
 25. F. R. Carbone, S. J. Sterry, J. Butler, S. Rodda, M. W. Moore, T cell receptor alpha-chain pairing determines the specificity of residue 262 within the Kb-restricted, ovalbumin257-264 determinant. *Int Immunol* **4**, 861–867 (1992).
 26. C. Attallah, M. Etcheverrigaray, R. Kratje, M. Oggero, A highly efficient modified human serum albumin signal peptide to secrete proteins in cells derived from different mammalian species. *Protein Expr Purif* **132**, 27–33 (2017).
 27. J. Massagué, Epidermal growth factor-like transforming growth factor. II. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membranes and A431 cells. *J Biol Chem* **258**, 13614–13620 (1983).
 28. J. M. Revest, L. DeMoerlooze, C. Dickson, Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J Biol Chem* **275**, 8083–8090 (2000).
 29. R. Sasada, R. Marumoto, K. Igarashi, Secretion of human EGF and IgE in mammalian cells by recombinant DNA techniques; use of a IL-2 leader sequence. *Cell*

Struct Funct **13**, 129–141 (1988).

30. J. N. Kochenderfer, Z. Yu, D. Frasher, N. P. Restifo, S. A. Rosenberg, Adoptive transfer of syngeneic T cells transduced with a chimeric antigen receptor that recognizes murine CD19 can eradicate lymphoma and normal B cells. *Blood* **116**, 3875–3886 (2010).
31. K. G. Mitchell, B. Gong, S. S. Hunter, D. Burkart-Waco, C. E. Gavira-O'Neill, K. M. Templeton, M. E. Goethel, M. Bzymek, L. M. MacNiven, K. D. Murray, M. L. Settles, L. Froenicke, J. S. Trimmer, High-volume hybridoma sequencing on the NeuroMabSeq platform enables efficient generation of recombinant monoclonal antibodies and scFvs for neuroscience research. *Sci Rep* **13**, 16200 (2023).
32. D. Patel, P. Balderes, A. Lahiji, M. Melchior, S. Ng, R. Bassi, Y. Wu, H. Griffith, X. Jimenez, D. L. Ludwig, D. J. Hicklin, X. Kang, Generation and characterization of a therapeutic human antibody to melanoma antigen TYRP1. *Human Antibodies* **16**, 127–136 (2007).
33. F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat Protoc* **2**, 2212–2221 (2007).
34. S. Foss, S. A. Sakya, L. Aguinagalde, M. Lustig, J. Shaughnessy, A. R. Cruz, L. Scheepmaker, L. Mathiesen, F. Ruso-Julve, A. K. Anthi, T. T. Gjølborg, S. Mester, M. Bern, M. Evers, D. B. Bratlie, T. E. Michaelsen, T. Schlothauer, D. Sok, J. Bhattacharya, J. Leusen, T. Valerius, S. Ram, S. H. M. Rooijackers, I. Sandlie, J. T. Andersen, Human IgG Fc-engineering for enhanced plasma half-life, mucosal distribution and killing of cancer cells and bacteria. *Nat Commun* **15**, 2007 (2024).
35. M. C. Jespersen, B. Peters, M. Nielsen, P. Marcatili, BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research* **45**, W24–W29 (2017).
36. B. Reynisson, B. Alvarez, S. Paul, B. Peters, M. Nielsen, NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research* **48**, W449–W454 (2020).
37. L. Jerby-Arnon, P. Shah, M. S. Cuoco, C. Rodman, M.-J. Su, J. C. Melms, R. Leeson, A. Kanodia, S. Mei, J.-R. Lin, S. Wang, B. Rabasha, D. Liu, G. Zhang, C. Margolais, O.

- Ashenberg, P. A. Ott, E. I. Buchbinder, R. Haq, F. S. Hodi, G. M. Boland, R. J. Sullivan, D. T. Frederick, B. Miao, T. Moll, K. T. Flaherty, M. Herlyn, R. W. Jenkins, R. Thummalapalli, M. S. Kowalczyk, I. Cañadas, B. Schilling, A. N. R. Cartwright, A. M. Luoma, S. Malu, P. Hwu, C. Bernatchez, M.-A. Forget, D. A. Barbie, A. K. Shalek, I. Tirosh, P. K. Sorger, K. Wucherpennig, E. M. V. Allen, D. Schadendorf, B. E. Johnson, A. Rotem, O. Rozenblatt-Rosen, L. A. Garraway, C. H. Yoon, B. Izar, A. Regev, A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. *Cell* **175**, 984-997.e24 (2018).
38. L. Tarhan, J. Bistline, J. Chang, B. Galloway, E. Hanna, E. Weitz, Single Cell Portal: an interactive home for single-cell genomics data. bioRxiv [Preprint] (2023). <https://doi.org/10.1101/2023.07.13.548886>.
 39. R. Evans, M. O'Neill, A. Pritzel, N. Antropova, A. Senior, T. Green, A. Židek, R. Bates, S. Blackwell, J. Yim, O. Ronneberger, S. Bodenstein, M. Zielinski, A. Bridgland, A. Potapenko, A. Cowie, K. Tunyasuvunakool, R. Jain, E. Clancy, P. Kohli, J. Jumper, D. Hassabis, Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer. bioRxiv [Preprint] (2022). <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>.
 40. C. Zincarelli, S. Soltys, G. Rengo, J. E. Rabinowitz, Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Molecular Therapy* **16**, 1073–1080 (2008).
 41. M. Muraoka, H. Hasegawa, M. Kohno, A. Inoue, T. Miyazaki, M. Terada, M. Nose, M. Yasukawa, IK cytokine ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis & Rheumatism* **54**, 3591–3600 (2006).
 42. D. Saerens, M. Pellis, R. Loris, E. Pardon, M. Dumoulin, A. Matagne, L. Wyns, S. Muyldermans, K. Conrath, Identification of a Universal VHH Framework to Graft Non-canonical Antigen-binding Loops of Camel Single-domain Antibodies. *Journal of Molecular Biology* **352**, 597–607 (2005).
 43. M. H. Kubala, O. Kovtun, K. Alexandrov, B. M. Collins, Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex. *Protein Science* **19**, 2389–2401 (2010).
 44. D. Kamiyama, S. Sekine, B. Barsi-Rhyne, J. Hu, B. Chen, L. A. Gilbert, H. Ishikawa, M. D. Leonetti, W. F. Marshall, J. S. Weissman, B. Huang, Versatile protein tagging in

- cells with split fluorescent protein. *Nat Commun* **7**, 11046 (2016).
45. C. Nishi, Y. Yanagihashi, K. Segawa, S. Nagata, MERTK tyrosine kinase receptor together with TIM4 phosphatidylserine receptor mediates distinct signal transduction pathways for efferocytosis and cell proliferation. *J Biol Chem* **294**, 7221–7230 (2019).
 46. I. J. Fidler, M. L. Kripke, Metastasis Results from Preexisting Variant Cells Within a Malignant Tumor. *Science* **197**, 893–895 (1977).
 47. B. Schrand, E. Clark, A. Levay, A. R. Capote, O. Martinez, R. Brenneman, I. Castro, E. Gilboa, Hapten-mediated recruitment of polyclonal antibodies to tumors engenders antitumor immunity. *Nat Commun* **9**, 3348 (2018).
 48. Y. Carmi, M. H. Spitzer, I. L. Linde, B. M. Burt, T. R. Prestwood, N. Perlman, M. G. Davidson, J. A. Kenkel, E. Segal, G. V. Pusapati, N. Bhattacharya, E. G. Engleman, Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature* **521**, 99–104 (2015).
 49. A. C. Nathwani, E. G. D. Tuddenham, S. Rangarajan, C. Rosales, J. McIntosh, D. C. Linch, P. Chowdary, A. Riddell, A. J. Pie, C. Harrington, J. O’Beirne, K. Smith, J. Pasi, B. Glader, P. Rustagi, C. Y. C. Ng, M. A. Kay, J. Zhou, Y. Spence, C. L. Morton, J. Allay, J. Coleman, S. Sleep, J. M. Cunningham, D. Srivastava, E. Basner-Tschakarjan, F. Mingozzi, K. A. High, J. T. Gray, U. M. Reiss, A. W. Nienhuis, A. M. Davidoff, Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *New England Journal of Medicine* **365**, 2357–2365 (2011).
 50. F. Xue, H. Li, X. Wu, W. Liu, F. Zhang, D. Tang, Y. Chen, W. Wang, Y. Chi, J. Zheng, Z. Du, W. Jiang, C. Zhong, J. Wei, P. Zhu, R. Fu, X. Liu, L. Chen, X. Pei, J. Sun, T. Cheng, R. Yang, X. Xiao, L. Zhang, Safety and activity of an engineered, liver-tropic adeno-associated virus vector expressing a hyperactive Padua factor IX administered with prophylactic glucocorticoids in patients with haemophilia B: a single-centre, single-arm, phase 1, pilot trial. *The Lancet Haematology* **9**, e504–e513 (2022).
 51. S. Jilani, J. D. Saco, E. Mugarza, A. Pujol-Morcillo, J. Chokry, C. Ng, G. Abril-Rodriguez, D. Berger-Manerio, A. Pant, J. Hu, R. Gupta, A. Vega-Crespo, I. Baselga-Carretero, J. M. Chen, D. S. Shin, P. Scumpia, R. A. Radu, Y. Chen, A. Ribas, C. Puig-Saus, CAR-T cell therapy targeting surface expression of TYRP1 to treat cutaneous and rare melanoma subtypes. *Nat Commun* **15**, 1244 (2024).

52. W. Xiong, R. G. Lahita, Pragmatic approaches to therapy for systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* **10**, 97–107 (2014).
53. A. Mackensen, F. Müller, D. Mougiakakos, S. Böltz, A. Wilhelm, M. Aigner, S. Völkl, D. Simon, A. Kleyer, L. Munoz, S. Kretschmann, S. Kharboutli, R. Gary, H. Reimann, W. Rösler, S. Uderhardt, H. Bang, M. Herrmann, A. B. Ekici, C. Buettner, K. M. Habenicht, T. H. Winkler, G. Krönke, G. Schett, Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. *Nat Med* **28**, 2124–2132 (2022).
54. M. Doglio, A. Ugolini, C. Bercher-Brayer, B. Camisa, C. Toma, R. Norata, S. Del Rosso, R. Greco, F. Ciceri, F. Sanvito, M. Casucci, A. A. Manfredi, C. Bonini, Regulatory T cells expressing CD19-targeted chimeric antigen receptor restore homeostasis in Systemic Lupus Erythematosus. *Nat Commun* **15**, 2542 (2024).
55. R. Kunert, D. Reinhart, Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 3451–3461 (2016).
56. B. Tihanyi, L. Nyitray, Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies* **38**, 25–34 (2020).
57. W.-J. Xu, Y. Lin, C.-L. Mi, J.-Y. Pang, T.-Y. Wang, Progress in fed-batch culture for recombinant protein production in CHO cells. *Appl Microbiol Biotechnol* **107**, 1063–1075 (2023).
58. J. Mukherjee, I. Dmitriev, M. Debatis, J. M. Tremblay, G. Beamer, E. A. Kashentseva, D. T. Curiel, C. B. Shoemaker, Prolonged Prophylactic Protection from Botulism with a Single Adenovirus Treatment Promoting Serum Expression of a VHH-Based Antitoxin Protein. *PLOS ONE* **9**, e106422 (2014).
59. O. A. Mandrup, S. C. Ong, S. Lykkemark, A. Dinesen, I. Rudnik-Jansen, N. F. Dagnæs-Hansen, J. T. Andersen, L. Alvarez-Vallina, K. A. Howard, Programmable half-life and anti-tumour effects of bispecific T-cell engager-albumin fusions with tuned FcRn affinity. *Commun Biol* **4**, 1–11 (2021).
60. M. Pyzik, K. M. K. Sand, J. J. Hubbard, J. T. Andersen, I. Sandlie, R. S. Blumberg, The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Front Immunol* **10**, 1540 (2019).
61. M. Pyzik, L. K. Kozicky, A. K. Gandhi, R. S. Blumberg, The therapeutic age of the neonatal Fc receptor. *Nat Rev Immunol* **23**, 415–432 (2023).

62. New insights and long-term safety of tocilizumab in rheumatoid arthritis - Graeme Jones, Elena Panova, 2018. <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1759720X18798462>.
63. J. A. Jazayeri, G. J. Carroll, Fc-Based Cytokines. *BioDrugs* **22**, 11–26 (2008).
64. R. Vazquez-Lombardi, C. Loetsch, D. Zinkl, J. Jackson, P. Schofield, E. K. Deenick, C. King, T. G. Phan, K. E. Webster, J. Sprent, D. Christ, Potent antitumour activity of interleukin-2-Fc fusion proteins requires Fc-mediated depletion of regulatory T-cells. *Nat Commun* **8**, 15373 (2017).
65. C. Ackaert, N. Smiejowska, C. Xavier, Y. G. J. Sterckx, S. Denies, B. Stijlemans, Y. Elkrim, N. Devoogdt, V. Caveliers, T. Lahoutte, S. Muyldermans, K. Breckpot, M. Keyaerts, Immunogenicity Risk Profile of Nanobodies. *Front. Immunol.* **12** (2021).
66. A. Ramon, M. Ali, M. Atkinson, A. Saturnino, K. Didi, C. Visentin, S. Ricagno, X. Xu, M. Greenig, P. Sormanni, Assessing antibody and nanobody nativeness for hit selection and humanization with AbNatiV. *Nat Mach Intell* **6**, 74–91 (2024).
67. J.-J. Lv, H. Wang, C. Zhang, T.-J. Zhang, H.-L. Wei, Z.-K. Liu, Y.-H. Ma, Z. Yang, Q. He, L.-J. Wang, L.-L. Duan, Z.-N. Chen, H. Bian, CD147 Sparks Atherosclerosis by Driving M1 Phenotype and Impairing Efferocytosis. *Circulation Research* **134**, 165–185 (2024).
68. F. N. Mohd Idrus, N. S. Ahmad, C. H. Hoe, M. Azlan, F. A. Norfuad, Z. Yusof, W. Y. H. Wan Isa, A. A. Mohamed Ali, G. B. Yvonne-Tee, Differential polarization and the expression of efferocytosis receptor MerTK on M1 and M2 macrophages isolated from coronary artery disease patients. *BMC Immunology* **22**, 21 (2021).
69. De novo development of small cyclic peptides that are orally bioavailable | Nature Chemical Biology. <https://www.nature.com/articles/s41589-023-01496-y>.
70. N. I. Edman, A. Phal, R. L. Redler, T. Schlichthaerle, S. R. Srivatsan, D. D. Ehnes, A. Etemadi, S. J. An, A. Favor, Z. Li, F. Praetorius, M. Gordon, T. Vincent, S. Marchiano, L. Blakely, C. Lin, W. Yang, B. Coventry, D. R. Hicks, L. Cao, N. Bethel, P. Heine, A. Murray, S. Gerben, L. Carter, M. Miranda, B. Negahdari, S. Lee, C. Trapnell, Y. Zheng, C. E. Murry, D. K. Schweppe, B. S. Freedman, L. Stewart, D. C. Ekiert, J. Schlessinger, J. Shendure, G. Bhabha, H. Ruohola-Baker, D. Baker, Modulation of FGF pathway signaling and vascular differentiation using designed oligomeric assemblies. *Cell*, doi:

10.1016/j.cell.2024.05.025 (2024).

71. R. Krishna, J. Wang, W. Ahern, P. Sturmfels, P. Venkatesh, I. Kalvet, G. R. Lee, F. S. Morey-Burrows, I. Anishchenko, I. R. Humphreys, R. McHugh, D. Vafeados, X. Li, G. A. Sutherland, A. Hitchcock, C. N. Hunter, A. Kang, E. Brackenbrough, A. K. Bera, M. Baek, F. DiMaio, D. Baker, Generalized biomolecular modeling and design with RoseTTAFold All-Atom. *Science*, doi: 10.1126/science.adl2528 (2024).
72. P. Gogesch, S. Dudek, G. van Zandbergen, Z. Waibler, M. Anzaghe, The Role of Fc Receptors on the Effectiveness of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 8947 (2021).
73. K. Hiruma, R. Hirsch, M. Patchen, J. A. Bluestone, R. E. Gress, Effects of Anti-CD3 Monoclonal Antibody on Engraftment of T-Cell-Depleted Bone Marrow Allografts in Mice: Host T-Cell Suppression, Growth Factors, and Space. *Blood* **79**, 3050–3058 (1992).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、京都大学生命科学研究科統合生命科学専攻才物動態生化学分野生体構造解析学講座の鈴木淳教授には終始丁寧なご指導を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。京都大学医学研究科の松田道行客員教授、並びに京都大学生命科学研究科高次生命科学専攻生体システム学分野の木村郁夫教授には副指導教員として多くの助言を頂きました。京都大学医生物学研究所の宮地均先生には、ノックインマウスの作製に関してご教授頂きました。京都大学生命科学研究科の圓岡真宏特定講師には、細胞をご供与して頂くと共に、実験に関して多くのご助言を賜りました。北海道大学医学研究院細胞生理学教室の水谷龍明講師には博士前期課程を通じて多くの実験技術、特に腫瘍移植マウスモデルに関してご教授頂き、この場で厚く御礼申し上げます。

また、鈴木研究室の皆様には、研究に関するディスカッションや、研究を遂行するための諸事にわたりご助力頂いたこと心より感謝申し上げます。最後に、これまで心身共に多くのサポートをして頂いた両親、祖父母、妹達に深く感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yuki Yamato and Jun Suzuki

Phagocytic clearance of targeted cells with a synthetic ligand

Nature Biomedical Engineering, in press, 2025