

論文の内容の要旨

論文題目 体外免疫法を利用した高速抗体取得方法の開発

氏名 稲垣 貴之

本論文では、体外免疫法を用いた抗体の取得方法の開発を目的としている。

抗体とは、生体内の免疫反応の一端を担う蛋白質で、特定の物質（抗原）に特異的に結合することが出来る性質や、他の免疫系の細胞を活性化するなどの様々な働きをする。この性質を利用して、疾患の検出・診断や、疾患の治療など幅広く利用されている。従来は、生体に抗原を注射等の方法で投与することで免疫を実施し、生体内の免疫反応を利用して抗体を取得する。この従来法では、生体反応を待つ必要があり、抗体の取得までに非常に長い期間を要する。また、生体に投与する抗原量が多く、調製が困難な物質の免疫や、生体に対して毒性を示す抗原の免疫は非常に困難であった。このような状況の下、1980年代から生体外で免疫を実施する体外免疫方法の研究がなされた。

これまでの体外免疫方法では、①T細胞が多く含まれる胸腺細胞を培養し、その培養液でB細胞を活性化する手法、②抗原で活性化したT細胞と共培養する手法、③サイトカインや抗体を添加して、B細胞に刺激を加える手法などが提案されている。しかしながら、再現性や汎用性の点で問題があった。さらに、誘導したい免疫反応の詳細が明らかでない等の問題から検証が不十分な点が考えられた。

今回我々は、高親和性抗体を得る為には、SHMを誘導し、抗体の親和性を変化させることが必要であると考え、SHMの誘導に必要な因子を探索した。その結果、GCの形成と、AIDの発現誘導という2つの因子に着目した。特にAIDは、実際に抗体の遺伝子に点変異を入れる為の重要な酵素であり、その発現誘導がSHMにとって重要な事が考えられた。

第2章において、このAIDの発現誘導と、GCの形成が可能な体外免疫方法の開発を行った。

これまでにAIDの発現誘導に関しては、anti-CD38抗体によって刺激したB細胞にIL-4刺激とIL-5刺激を加える事で誘導可能である事が報告されている。さらに、GCの形成においては、生体内では、ヘルパーT細胞との相互作用によって誘導されることが知られており、ヘルパーT細胞からの刺激の主要な成分はCD40-CD40 ligandの相互作用である事も示されている。これらの調査結果から、T細胞性の刺激物質としてIL-4、

IL-5、anti-CD38 抗体、anti-CD40 抗体の 4 種類を用いることとした。

これら 4 種類を様々な組み合わせで使用し、抗原の有無で AID 発現量に差異のある組み合わせを検討した。その結果、この 4 種の因子全てを用いた組み合わせ (TDS) によって優位な差異が確認できた。AID の発現量自体は、免疫前の 64 倍(抗原無添加の場合の 1.7 倍)であった。さらに、ここに T 細胞非依存性刺激物質である LPS を添加することで、大幅に発現量を向上させられることを発見した。LPS+TDS 刺激によって、免疫前の 363 倍 (抗原無添加の場合の 2.6 倍) にまで発現を上昇させることに成功した。

一方、GC の遺伝子マーカーである Bcl-6 に関しては、免疫前よりも発現量が減少するという現象が観察され、脾臓から調製直後の細胞は休止期の B 細胞であり、Bcl-6 を高発現しているという過去の報告例と相関する結果となった。しかし、LPS+TDS 刺激によって抗原の有無での発現量の差異が確認されている事、Bcl-6 も培養日数を経るごとに発現量が上昇している事から、LPS+TDS で GC も誘導されている事が示唆された。

つぎに細胞の表面抗原の発現量によって分類し、GC や Plasmablast の形成を確認した。その結果、免疫後 2 日間培養することで GC に似たフェノタイプを示す細胞 GC like B cell の誘導が観察され、その後 Pre-PB like B cell や Pre-GC like B cell 等、GC への分化途中、Plasmablast への分化途中の細胞などが検出され、LPS+TDS による GC の形成が確認できた。また、LPS は、B 細胞の活性化や Plasmablast の分化誘導には働くものの、GC の形成は TDS が優位に働くことが示された。生体内において GC の形成は T 細胞からの刺激によって誘導されることから、生体外においても、T 細胞性の刺激によって GC を形成させることが出来ることが示された。

これまでの体外免疫法の問題点であった再現性を確保し、GC の形成と AID の発現誘導を実現する手法として、LPS+TDS 刺激による免疫方法を確立した。

第 3 章では、第 2 章において確立した体外免疫法を用いた抗体取得方法の確立と、抗原 HEL の免疫、SHM の誘導確認と anti-HEL 抗体の取得を実施した。

確立した体外免疫法を用いて、免疫した細胞から、scFv を構築する高速抗体取得方法(RAntIS 法)を考案し、構築した。scFv 化する際に、V_H 鎖と V_L 鎖をシャフリングすることで、 10^{10} ~ 10^{14} という非常に大きい抗体ライブラリーを構築することが出来た。また、抗体の活性確認まで、免疫スタートから約 10 日間と非常に短縮することが出来、迅速な抗体取得方法となった。

RAntIS 法を用いて、免疫後の培養時間と得られる抗体の活性・特異性を検討した。その結果、培養 5 日後が最も効率よく抗体が取得出来ること、培養日数を延ばすと、活性が低いクローンが優位に得られることが明らかとなった。また、得られたクローンの遺伝子配列を決定し、ゲノム上の抗体遺伝子との比較により、体細胞変異の有無を確認した。その結果、どのクローンもゲノム上の配列と比較して変異が蓄積されているという結果となった。培養日数ごとに解析すると、培養 5 日目以降は約 10 か所のアミノ酸置換を伴う変異が蓄積されているという結果となった。今回は活性のあるクローンとし

てスクリーニングしたのちに配列解析を実施しているため、活性のあるクローンは、平均 10 か所前後の変異を蓄積している事が示された。過去において、高親和性抗体への変異の蓄積数を解析した研究から、高親和性抗体には 5~10 箇所の変異が蓄積されている事が報告されており、今回得た解析結果と関連していた。

得られた scFv クローンのうち、活性の高いクローンの親和性を BIACORE にて解析した結果、78 nM ($k_{on} : 2.86 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ 、 $k_{off} : 2.33 \times 10^{-3} s^{-1}$)と、 $10^{-8}M$ オーダーであった。また、免疫した細胞をハイブリドーマ化し、抗原特異的な IgG クローンを得た。その親和性は、0.5 nM ($k_{on} : 9.9 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、 $k_{off} : 5.5 \times 10^{-4} s^{-1}$)と、非常に親和性の高い抗体が得られた。この活性であれば、血液中の微量成分も検出可能であり、IgG である為汎用性も高い抗体を得ることが出来た。従来法で得た抗体は $10^{-8} \sim 10^{-9}M$ の抗体であり、scFv 化することでやはり、10~100 倍活性が低下していた。これらのことから、我々の手法は抗原を特異的に免疫して、高親和性抗体を得ることのできる非常に優れた手法である事が示された。得られた IgG の活性を比較すると、我々の手法では、活性の非常に高い抗体も得られるものの、その大多数は通常の抗体レベルの活性であり、アフィニティマチュレーションによる高親和性抗体発現細胞のみを濃縮できていないことが示唆された。生体外において、抗原を免疫し、体細胞変異を誘導し、かつ非常に高い活性の抗体を得ることが出来る手法を確立することが出来た。

第 4 章では、低分子量ペプチドを免疫し、特異的抗体を得ることに成功した。

体外免疫法のメリットとして、低分子化合物の免疫が容易な点や、自己抗体の免疫が可能な点が考えられている。実際に低分子化合物の免疫に関しては報告例があり、従来法では必要不可欠な、キャリアタンパク質とのコンジュゲートの作製が不要というメリットが報告されている。しかし、取得効率は非常に低いものであった。今回我々は、7 mer ~ 24 mer の低分子ペプチドを直接免疫し、抗体を取得することに成功した。抗原として、HEL を免疫した場合と比較すると、GC 細胞の形成数が少なくなっており、免疫原性が低いことに起因すると思われる、免疫反応の微弱化は見られたものの、他のペプチドに対して反応性の低いクローン（特異性の高いクローン）を得ることに成功した。本法では、HEL を免疫した際と同様、スクリーニングしたクローンのうち約 30% が抗原に対して特異的なクローンであり、非常に効率よく抗体を取得出来る手法である事が示された。

本法では、低分子量ペプチドをキャリアタンパク質にコンジュゲートすることなく、直接免疫し、抗体を取得することに成功した。抗体の取得自体はこれまでも報告されているが、これまでの報告例と比較しても、非常に高効率で取得することが出来る手法である事が示された。

第 5 章では、体外免疫法のもう一つのメリットと考えられる自己抗原に対する抗体を取得した。

マウス由来の S100A10 という自己抗原及び、非常にホモロジーの高いヒト由来の

S100A10 を免疫し、抗体を得ることに成功した。

また、これらの抗体は、脾臓細胞ではなく、B 細胞を免疫した場合でも同様に抗体が取得出来、当初の想定通り、LPS+TDS によって T 細胞からの刺激を代替することができたことが示された。この事から、先述の通り、培養細胞を用いた免疫も可能である事が示唆された。培養細胞として生体内以上の抗体ライブラリーを作製することが出来れば、さらに汎用性の高い抗体取得法となることが示唆された。

同時に、IgG への CSR を確認したところ、得られたクローンのうち 50%~90%と非常に高い確率で IgG が取得できており、本法で CSR が誘導されている事が示された。

このように、CSR や SHM を誘導可能な、体外免疫法の構築と、それをベースとした抗体取得方法を開発した。この手法では、非常に高効率で抗体を取得できるうえ、低分子量ペプチドや自己抗原も免疫可能である等、様々なメリットが確認できた。

本法では実現できていないが、アフィニティマチュレーションによる抗原特異的高親和性抗体を産生している細胞を特異的に濃縮する手法と、高親和性抗体の SHM を停止する、Plasmablast への分化誘導の手法を組み合わせ、かつ iPS 細胞等から誘導した B 細胞ライブラリーの開発し免疫に使用するという 3 点を解決することで、完全な生体外での抗体取得方法の構築が可能であると考えられ、生体外での抗原の免疫における問題を一つ解決した手法を構築することが出来た。