

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04196

研究課題名（和文）スプライシング因子の新規機能を利用した動物細胞ディスプレイ技術の高度化

研究課題名（英文）Improvement of an animal cell-displaying technology by using a splicing factor

研究代表者

金山 直樹（Kanayama, Naoki）

岡山大学・ヘルスシステム統合科学研究科・准教授

研究者番号：70304334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,800,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、抗体遺伝子の変異能力を有するニワトリB細胞株DT40を利用して動物細胞ディスプレイ技術を構築した。本研究では、抗原結合による生存シグナルの惹起と抗体遺伝子変異の誘導におけるSRSF1の機能の一端を明らかにし、スプライシング因子の発現操作により、外来からDT40細胞に導入した抗体遺伝子、非抗体遺伝子への変異導入効率を向上させるのに有効であることを見いだした。一方、変異導入効率に有効な導入遺伝子の最適化法も見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標的に特異的に結合する抗体は、抗体医薬と呼ばれる副作用の低い次世代の分子標的治療薬として活用されてきている。抗体医薬開発での問題の一つに抗体ライブラリーの多様性の不足が考えられ、本研究は有用な活性を有する変異抗体を含む質の高い抗体ライブラリーの効率的作製に寄与しうる。

研究成果の概要（英文）：We have been developing an animal cell-displaying technology using the hypermutating B cell line DT40. In this study, we elucidated a function of a splicing factor, SRSF1, which we have previously found that is essential for hypermutation of the immunoglobulin gene, and developed a method to increase hypermutation efficiency by manipulation of SRSF1 expression.

研究分野：細胞工学、抗体工学

キーワード：抗体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

標的に特異的に結合する抗体は、抗体医薬と呼ばれる副作用の低い次世代の分子標的治療薬として活用されてきている。しかし、医薬として有効な抗体作製に成功している標的は限られており、抗体作製が困難な標的があることが問題となっている。この問題の原因の一つとして、従来技術で生成される抗体ライブラリーの多様性の不足が考えられる。さらに、有用抗体取得の効率化のために、取得抗体に変異導入して効率的に親和性を向上させる親和性成熟の技術が非常に求められている。これらの問題を解決するために、ファージディスプレイ法などの *in vitro* 抗体作製技術が用いられている。この技術では、抗原を固定した磁気ビーズを用いて変異抗体ライブラリーから抗原特異的抗体を提示するファージ粒子を単離する。しかし、ライブラリー作製時に導入するランダム変異の大部分は標的抗体タンパク質を失活させること、抗体ライブラリーに多く含まれる低親和性抗体や非特異的抗体による擬陽性が多いことが問題となっている。したがって、有用な活性を有する変異抗体を含む質の高い抗体ライブラリーの作製と、膨大なライブラリー中からの有用抗体の効率的単離は抗体作製において非常に大きな課題である。

### 2. 研究の目的

標的に特異的に結合する抗体は、近年、医薬への利用が進んでいる。申請者は、抗体遺伝子の変異能力を有するニトリ B 細胞株 DT40 を利用して動物細胞ディスプレイ技術を構築した。その過程で、スプライシング因子 SRSF1 の操作により抗原と結合した特異的抗体産生細胞のみを生存により選別可能であり、しかもこの因子が抗体遺伝子変異にも関与することを発見した。本研究では、抗原結合による生存シグナルの惹起と抗体遺伝子変異の誘導における SRSF1 の機能を解明し、抗体ライブラリー作製と目的抗体産生細胞の選択を高度に効率化するための基盤研究を行う。抗体遺伝子への変異導入、構造的に安定な変異抗体を発現する細胞の濃縮、高親和性抗体産生細胞の選択を高度化し、有用な活性を有した抗体創出の効率化を図る。

### 3. 研究の方法

DT40 細胞は、抗体を細胞表面に提示かつ細胞外に分泌し、培養のみで抗体遺伝子に変異を導入する。また、高頻度の相同組換えによって遺伝子改変が容易である。申請者は、これらの性質を利用して変異能力を ON/OFF できる細胞株 DT40-SW を樹立し、抗体作製技術を開発した。本研究では、申請者が発見したスプライシング因子 SRSF1-3 を DT40-SW 細胞において操作し、抗体ライブラリー形成の高度化および有用抗体の単離の簡便化のための基盤技術を確立する。

### 4. 研究成果

#### 4.1 スプライシング因子の高発現による変異頻度の増強

我々が体細胞高頻度突然変異に必須の因子として発見したスプライシング因子 SRSF1-3 の過剰発現による変異増強を試みた。SRSF1-3 発現ベクターを導入した安定形質転換体において、SRSF1-3 の発現が安定に維持されなかったことから、発現カセットを DT40 ゲノムの特定の遺伝子座に組み込んだ細胞株を作製した。この細胞株では SRSF1-3 の発現は安定に維持され、変異能力も野生型に比べて増強することに成功した。

更なる検討により、変異の標的遺伝子として初期変異導入頻度の低い遺伝子で SRSF1-3 発現の効果が高い傾向にあった。また、高度に変異を増強するにはあるしきい値以上の SRSF1-3 の過剰発現が必要であることを示唆する結果が得られた。この結果の一つの可能性として何らかの競合的な内在因子の可能性が示唆され、SRSF1-3 の作用機序との関連から今後詳細に検討する必要がある。

SRSF1-3 の機能部位に関する検討により、変異導入に関与する部位を一部同定した他、SRSF1-3 の AID 機能への関与の検討では、SRSF1-3 が AID の局在に関与することを示唆する結果も得られた。これらの SRSF1-3 機能を操作することにより効率的な変異増強も可能であると考えられる。

#### 4.2 導入遺伝子の最適化による変異頻度の増強

変異導入装置の増強は、オフターゲット遺伝子への変異導入により、場合によっては遺伝毒性につながる可能性がある。したがって、変異導入装置の増強ではなく、変異導入の基質である抗体遺伝子の配列を最適化することを試みた。変異導入装置の基質特異性に沿って改変した遺伝子断片を、元の抗体遺伝子と置換した DT40 細胞を作製した。この原因を検討するため、複数の遺伝子に変異導入配列を導入して変異頻度を検討したところ、効果が顕著な遺伝子と、そうでは無い遺伝子があることが分かった。オリジナルの遺伝子の変異頻度が高い場合には、変異導入配列の効果が弱くなることから、変異導入装置の細胞内の量といった別のファクターが律速となっている可能性がある。一方、オリジナルの遺伝子で変異頻度が低い場合は、変異頻度の上昇効果は顕著であり、そのようなタイプの遺伝子の場合の改善策として変異導入配列の導入は有効であろう。どのような一次配列上の違いが元々の変異導入頻度を決定しているのかは今後の課題である。本研究で検討していた SRSF1-3 の過剰発現による変異増強との共用については効果が確認されたことから、変異導入の効率化に、SRSF1-3 過剰発現による変異導入装置の活性化と、変異導入装置の基質配列の導入の

両方を使用することが有効であることが示唆された。

#### 4.3 非典型抗体の発現と変異導入

抗体医薬として上市されているモノクローナル抗体 2 例を単鎖抗体化して、Fc 融合タンパクとして DT40 細胞に発現させることを試みた。ヒト IgG1 Fc を発現する細胞はこれまでに樹立している。一つのモノクローナル抗体は重鎖可変部(VH)と軽鎖可変部(VL)を VH-VL、VL-VH どちらの順で DT40 細胞に導入しても発現したのに対して、一方の抗体では、VH-VL でのみ検討したところ発現しなかった。詳細のその原因を検討すると、発現しない方ではスプライシングに異常が見られた。単鎖抗体をコードする人工 DNA の設計段階でのコドンの選択により、ゲノム上の導入された後、転写後プロセッシングに必要な Exon Splicing enhancer の分布が変わったことが原因とみられる。DT40 細胞に外来抗体遺伝子可変部を導入する際は、可変部のみに変異を限定するために定常部との間にイントロンが挿入された野生型遺伝子配列を保持していることから、導入遺伝子上のスプライシング関連シスエレメントについても分析する必要性が明らかになった。また、発現可能であった方の単鎖抗体については変異導入も可能であることから、本研究計画で構築してきた変異導入頻度の増強技術を用いてライブラリー構築を効率化し、親和性成熟も可能であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Ogawa, S., Matsuoka, Y., Takada, M., Matsui, K., Yamane, F., Kubota, E., Yasuhara, S., Hieda, K., Kanayama, N., Hatano, N., Tokumitsu, H. & Magari, M. Interleukin 34 (IL-34) cell-surface localization regulated by the molecular chaperone 78-kDa glucose-regulated protein facilitates the differentiation of monocytic cells. *J Biol Chem* **294**, 2386-2396 (2019). doi:10.1074/jbc.RA118.006226. 査読あり
2. Takabatake, S., Ohtsuka, S., Sugawara, T., Hatano, N., Kanayama, N., Magari, M., Sakagami, H. & Tokumitsu, H. Regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase by cAMP signaling. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1863**, 672-680 (2019). doi:10.1016/j.bbagen.2018.12.012. 査読あり
3. Sakane, K., Yamaguchi, F., Tsuchiya, M., Kondo, R., Kanayama, N., Magari, M., Hatano, N., Kobayashi, R. & Tokumitsu, H. Interaction of S100A6 with Target Proteins In Vitro and in Living Cells. *Methods Mol Biol* **1929**, 367-377 (2019). doi:10.1007/978-1-4939-9030-6\_23. 査読あり
4. Nakanishi, A., Hatano, N., Fujiwara, Y., Bin Shari, A., Takabatake, S., Akano, H., Kanayama, N., Magari, M., Nozaki, N. & Tokumitsu, H. AMP-activated protein kinase-mediated feedback phosphorylation controls the Ca(2+)/calmodulin (CaM) dependence of Ca(2+)/CaM-dependent protein kinase kinase. *J Biol Chem* **292**, 19804-19813 (2017). doi:10.1074/jbc.M117.805085. 査読あり
5. Sakane, K., Nishiguchi, M., Denda, M., Yamaguchi, F., Magari, M., Kanayama, N., Morishita, R. & Tokumitsu, H. Identification and characterization of a centrosomal protein, FOR20 as a novel S100A6 target. *Biochem Biophys Res Commun* **491**, 980-985 (2017). doi:10.1016/j.bbrc.2017.07.161. 査読あり
6. Kawaguchi, Y., Nariki, H., Kawamoto, N., Kanehiro, Y., Miyazaki, S., Suzuki, M., Magari, M., Tokumitsu, H. & Kanayama, N. SRSF1-3 contributes to diversification of the immunoglobulin variable region gene by promoting accumulation of AID in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* **485**, 261-266 (2017). doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.097. 査読あり
7. Fujiwara, Y., Kawaguchi, Y., Fujimoto, T., Kanayama, N., Magari, M. & Tokumitsu, H. Differential AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Recognition Mechanism of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase Isoforms. *J Biol Chem* **291**, 13802-13808 (2016). doi:10.1074/jbc.M116.727867. 査読あり
8. Furuya, Y., Denda, M., Sakane, K., Ogusu, T., Takahashi, S., Magari, M., Kanayama, N., Morishita, R. & Tokumitsu, H. Identification of striated muscle activator of Rho signaling (STARS) as a novel calmodulin target by a newly developed genome-wide screen. *Cell Calcium* **60**, 32-40 (2016). doi:10.1016/j.ceca.2016.04.004. 査読あり

〔学会発表〕(計 33 件)

1. 金山 直樹, 曲 正樹, 徳光 浩ら; スプライシング因子の過剰発現及び標的遺伝子配列の操作によるニワトリ B 細胞株における遺伝子変異の増強; 第 70 回 日本生物工学会大会; 2018 年
2. 大塚 里美, 金山 直樹, 曲 正樹, 徳光 浩ら; CaMKK シグナル伝達の AMPK および PKA

- によるリン酸化制御機構の解明；第91回日本生化学会大会；2018年
3. 松岡 由希子, 金山 直樹, 徳光 浩, 曲 正樹ら；濾胞樹状細胞が発現する IL-34 の免疫学的作用についての解析；第41回日本分子生物学会年会；2018年
  4. 高田 美帆, 金山 直樹, 徳光 浩, 曲 正樹ら；濾胞樹状細胞により誘導される単球系細胞によるB細胞活性化メカニズムの解明；第41回日本分子生物学会年会；2018年
  5. 小川 紗也香, 金山 直樹, 徳光 浩, 曲 正樹ら；GRP78により発現制御される濾胞樹状細胞表面の IL-34 が単球系細胞の分化に関与する；第41回日本分子生物学会年会；2018年
  6. 金山 直樹, 曲 正樹, 徳光 浩ら；抗体遺伝子変異能力を操作できるニワトリ B細胞を用いた動物細胞ディスプレイ；第69回日本生物工学会大会；2017年
  7. 太田 愛美, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹ら；スプライシング因子の過剰発現及び標的遺伝子配列の操作によるニワトリ B細胞株における遺伝子変異の増強；ConBio2017；2017年
  8. 安原 詩織, 金山 直樹, 徳光 浩, 曲 正樹ら；濾胞樹状細胞が発現する CSF-1 の単球系細胞分化への関与の解析；ConBio2017；2017年
  9. 金山 直樹, 曲 正樹, 徳光 浩ら；抗体遺伝子変異の転写関連過程における SRSF1-3 の役割の解析；ConBio2017；2017年
  10. 梶浦 雄也, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹ら；AID 発現と SHM 誘導における BCR シグナルの役割；ConBio2017；2017年
  11. 小川 紗也香, 金山 直樹, 徳光 浩, 曲 正樹ら；B細胞活性化能をもつ単球系細胞分化における IL-34 の新規な作用機構の解明；ConBio2017；2017年
  12. 太田 愛美, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹ら；スプライシング因子過剰発現による B細胞株における抗体遺伝子変異の増強；第68回日本生物工学会大会；2016年
  13. 藤原 侑哉, 金山 直樹, 曲 正樹, 徳光 浩ら；Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase シグナル伝達機構の動作原理の解明（基質認識機構）；第39回日本分子生物学会年会；2016年
  14. 梶浦 雄也, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹ら；AID 発現と SHM 誘導における BCR シグナルの役割；第39回日本分子生物学会年会；2016年
  15. 小川 紗也香, 徳光 浩, 金山 直樹, 曲 正樹ら；B細胞を活性化する新規単球系細胞の解析；IL-34 選択的な作用機構の解明；第39回日本分子生物学会年会；2016年
  16. 曲 正樹, 金山 直樹, 徳光 浩ら；単球系細胞により活性化された胚中心様 B細胞の機能解析；第39回日本分子生物学会年会；2016年
  17. 川口 祐加, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹ら；抗体遺伝子変異における転写依存性過程における SRSF1-3 の役割の解析；第39回日本分子生物学会年会；2016年
  18. 横山 和輝, 徳光 浩, 曲 正樹, 金山 直樹ら；抗体遺伝子高頻度突然変異における ssDNA 形成への SRSF1-3 の関与の解析；第39回日本分子生物学会年会；2016年
  19. 成木 弘明, 徳光 浩, 曲 正樹, 金山 直樹ら；SRSF1-3 の高度保存領域が抗体遺伝子変異に寄与する；第39回日本分子生物学会年会；2016年
  20. Naoki Kanayama, Masaki Magari, Hiroshi Tokumitsu, et al.; SRSF1-3 has a role in nuclear localization of AID by regulating its nuclear export; International Congress of Immunology 2016; 2016
  21. Yuka Kawaguchi, Masaki Magari, Hiroshi Tokumitsu, Naoki Kanayama, et al.; Analysis of a role for SRSF1-3 in a transcription-coupled process during IgV hypermutation; International Congress of Immunology 2016; 2016
  22. Masaki Magari, Naoki Kanayama, Hiroshi Tokumitsu, et al.; IL-34-dependent differentiation of monocytic cell with B cell stimulating activity; International Congress of Immunology 2016; 2016
  23. 金山 直樹, 曲 正樹, 徳光 浩ら；ニワトリ B細胞株における BCR シグナル依存性アポトーシスの制御による高親和性抗体の作製；第67回日本生物工学会大会、2015年
  24. 中谷 耕治, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山 直樹ら；ニワトリ B細胞株 DT40 におけるヒト型抗体の産生増強；第67回日本生物工学会大会、2015年
  25. Magari Masaki, Kanayama Naoki, Tokumitsu Hiroshi, et al.; IL-34/CDF-1R-dependent generation of a novel class of monocytic cells with unique B cell-stimulating activities; 2015 日本免疫学会学術集会 2015年
  26. KAWAGUCHI Yuka, TOKUMITSU Hiroshi, MAGARI Masaki, KANAYAMA Naoki, et al.; SRSF1-3 promotes nuclear localization of AID by inhibiting nuclear export of AID; 2015 日本免疫学会学術集会；2015年
  27. 坂根 恭平, 曲 正樹, 金山 直樹, 徳光 浩ら；インターラクトーム解析法を用いたヒト S100A6 標的分子の探索；BMB2015；2015年
  28. 横山 和輝, 徳光 浩, 曲 正樹, 金山 直樹ら；過剰発現させた RNaseH1 は核外へ隔離される；BMB2015；2015年
  29. 成木 弘明, 徳光 浩, 曲 正樹, 金山 直樹ら；ニワトリ SRSF1-3 の抗体遺伝子変異における機能部位の探索；BMB2015；2015年

30. 曲 正樹, 金山 直樹, 徳光 浩ら ; 濾胞樹状細胞依存的に誘導される単球系細胞により活性化された胚中心 B 細胞の機能解析 ; BMB2015 ; 2015 年
31. 小川 紗也香, 金山 直樹, 徳光 浩, 曲 正樹ら ; 濾胞樹状細胞依存的に発生する新規単球系細胞の分化機構の解明 ; CSF-1R に作用する IL-34 特異的作用の解析 ; BMB2015 ; 2015 年
32. 太尾田 泰成, 金山 直樹, 曲 正樹, 徳光 浩ら ; Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin 結合型転写因子の網羅的同定 ; BMB2015 ; 2015 年
33. 藤原 侑哉, 曲 正樹, 金山 直樹, 徳光 浩ら ; CaMKK による選択的 AMPK 活性化の細胞生物学および生化学的解析 ; BMB2015 ; 2015 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/saibou/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 : 徳光 浩

ローマ字氏名 : Hioroshi Tokumitsu

所属研究機関名 : 岡山大学

部局名 : 大学院 ヘルスシステム統合科学研究科

職名 : 教授

研究者番号(8桁) : 20237077

研究分担者氏名 : 曲 正樹

ローマ字氏名 : Masaki Magari

所属研究機関名 : 岡山大学

部局名 : 大学院 ヘルスシステム統合科学研究科

職名 : 助教

研究者番号(8桁) : 5059882