

令和元年6月24日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16328

研究課題名(和文) 完全ヒト抗体の簡便な単離と作製法の検討

研究課題名(英文) Convenient isolation and generation of fully human antibodies

研究代表者

相内 章 (Ainai, Akira)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：10572133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：感染症に対する抗体医薬としての完全ヒト抗体作製法の確立を目指し、「B細胞を一過性に増殖させるための培養条件」並びに「抗原特異的な膜型抗体を有するB細胞の選択法」に関する検討を行った。ODN2006、BAFF、IL-15、CD40リガンドならびにIL-6の5種類を混合した刺激下で培養することで、効率よく一過性にB細胞を増殖させることが可能であることを明らかにした。その一方で、パニング法による抗原特異的な抗体を有するB細胞の選択を試みたが、非特異な結合性を示す抗体を有するB細胞を排除できないことが課題として残された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

感染症の治療あるいは予防に応用可能な抗体医薬の開発は遅れている。現在主に利用されている抗体医薬はIgG抗体に限定されているが、IgA抗体による抗体医薬が開発できれば、粘膜経路で感染するウイルスや細菌に対して有益な治療・予防の手段になり得ると期待できる。有用なヒト抗体の選択法に関してはいくつかの手法が考案されているが、それぞれ利点・欠点がある。より簡便かつ効率のより有用なヒト抗体の選択法が確立できれば、抗体医薬開発に大きく貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was easy and simplified generation of fully human antibodies for therapeutic purpose against infectious diseases. In this study, "culture condition for transient propagation of human B cells" and "selection method of human memory B cells bearing antigen-specific surface antibody" were investigated. Cultivation of B cells in the presence of the combination of five stimulations (that is, ODN2006, BAFF, IL-15, soluble CD40-ligand and IL-6) was the most effective for transient propagation of them. The panning against antigen was chosen for the selection of human memory B cells, however, B cells bearing non-specific antibody against antigen were not completely excluded.

研究分野：抗体工学

キーワード：ヒト抗体 B細胞

1. 研究開始当初の背景

抗体は、免疫を担うタンパク質であり、異物に対して特異的に誘導される。近年、抗体を治療に用いる抗体医薬が注目されているが、その多くは主に癌やアレルギーを標的としており、感染症を対象とする抗体医薬の開発は遅れている。

1975年に Köhler と Milstein によって抗体産生 B 細胞とリンパ球系がん細胞 (ミエローマ) を融合するハイブリドーマ法が確立され、マウスにおいてモノクローナル抗体の作製が可能となった。しかしながら、ヒトでは抗体産生能を維持しながら増殖能を付与する適切な融合親株の開発が遅れ、ヒト抗体を産生するハイブリドーマ作製技術は開発途上にある。初期の抗体医薬はマウス抗体を使用したため、投与後、ヒトの免疫系により速やかに排除され効果が持続しない上に、繰り返しの投与が不可能であった。免疫原性を低減するために、マウスモノクローナル抗体的可変領域をヒト抗体の定常領域に遺伝的に組換えたキメラ抗体、抗原認識に最も重要と考えられる相補鎖決定領域 (CDRs) をヒト抗体に移植したヒト化抗体の作製が試みられている。しかしながら、残存するマウス由来のアミノ酸配列が原因となり、これら抗体を排除する免疫応答を誘導してしまうため、抗体医薬として利用される抗体は完全ヒト抗体であることが望まれている。

この完全ヒト抗体を作製する技術として、現在主に、ヒト抗体ライブラリーを利用したファージディスプレイ法、シングルセル PCR 法、ヒト抗体発現トランスジェニックマウスの利用、の 3 つの手法が考えられる。ヒト抗体ライブラリーを利用したファージディスプレイ法では、抗体遺伝子座の遺伝子再編成によりその多様性を獲得する。VH と VL の遺伝子ライブラリーから構築される可変領域には、原理的に抗原特異的なものが存在すると考えられ、この可変領域から組換え抗体を作製する。体内で選択される H 鎖と L 鎖の組合せとは限らず、その点が与える影響は不明である。シングルセル PCR 法は、患者あるいはワクチン接種者の末梢血から、シングルセルソーティング技術を用い抗原特異的な抗体を産生する単一 B 細胞を単離し、抗体遺伝子をクローニングし組換え抗体として発現させる。体内で選択された H 鎖と L 鎖の組合せとなるが、抗体の反応性・親和性は発現させるまで不明であり、スクリーニングに労力と時間を要すると考えられる。ヒト抗体発現トランスジェニックマウスの利用は、自由に抗原を接種すること (過免疫) が可能であり、直接ヒト抗体産生ハイブリドーマの作製が可能である。一方で、マウス免疫系におけるヒト抗体発現 B 細胞への抗原提示効率に不安を抱え、今後の発展が求められる。

以上 3 つの方法は、各々に優れた利点がある一方で、様々な解決すべき課題を抱えている。ヒト抗体ライブラリーから作製された Fab 断片をヒト IgG1 の定常領域に移植した完全ヒト抗体が抗体医薬として利用されているが、それでも抗体製剤に対し抗体応答が起こる事例が報告されている。この事実は、人為的に選択され組換え抗体として作製された完全ヒト抗体より、ヒトの免疫系で正しく選択された完全ヒト抗体が、医薬品としてより最適である可能性を示唆していると考えられる。

2. 研究の目的

完全ヒト IgA 抗体を作製する技術基盤を構築することを目標とし、ヒトの免疫系で正しく選択された完全ヒト抗体 (IgG や IgA) を選択・単離する古くて新しい手法の検討・開発を目的とする。既に、完全ヒト抗体作製技術の一つの可能性として、融合親株 6JC5 を用いた EBV-ハイブリドーマ法を既に確立している。ハイブリドーマ法により効率よく細胞融合を行うためには、過免疫を行い抗体産生細胞の割合を高めておくことが大前提となるが、ヒトでは倫理上難しく抗体産生細胞の割合が低いことが問題となる。抗原に対する特異的な抗体を発現 B する B 細胞を容易に選択し、その上で一過性に細胞を増殖させることができれば、抗体遺伝子のクローニング・完全ヒト抗体の作製が簡便になると期待できる。そこで本研究では、「抗原特異的な膜型抗体を有する B 細胞の選択」ならびに「選択した B 細胞を一過性に増殖させるための培養条件の検討」に関して検討を行う。

3. 研究の方法

ボランティアにより提供された末梢血から、MACS を用いて B 細胞を選択・濃縮する。末梢血中に存在するヒト記憶 B 細胞に対してトランスアクチベーターとして働くヒト型 CpG M

チーフ ODN2006、BAFF、IL-15、抗 CD40 抗体 (CD40 リガンド)、IL-6、もしくはそれらを組み合わせることで、一過性に B 細胞を活性化し増殖を促進する培養条件を検討する。B 細胞の増殖は WST 法により評価する。

また、末梢血中に存在する抗原特異的な抗体を細胞表面上に発現している記憶 B 細胞を効率よく選択するために、パニング法の条件検討を行う。

4. 研究成果

ボランティアから提供された B 細胞に対し、ODN2006、BAFF、IL-15、CD40 リガンドならびに IL-6 をそれぞれ単独で添加した場合、B 細胞の増殖はほとんど認められなかった。ODN2006、BAFF 及び IL-15 を混合して添加した場合に顕著な増殖が認められ、さらに CD40 リガンドと IL-6 を添加することで優位にその増殖が亢進することが明らかになった。5 種の混合刺激から、ODN2006、BAFF、IL-15、CD40 リガンドあるいは IL-6 を除いた場合、ODN2006 あるいは CD40 リガンドの除去で増殖が優位に減じた。このことから、ODN2006 と CD40 リガンドの 2 種混合刺激を検討したが、5 種混合刺激と比較すると優位に B 細胞の増殖は低かった。以上から、一過性に B 細胞を増殖させるには、終濃度で 12.5 µg/mL の ODN2006、200 ng/mL の BAFF、10 ng/mL の IL-15、250 ng/mL の CD40 リガンドおよび 20 pg/mL の IL-6 の 5 種類の刺激がもっとも効率が良いことを明らかにした (図)。

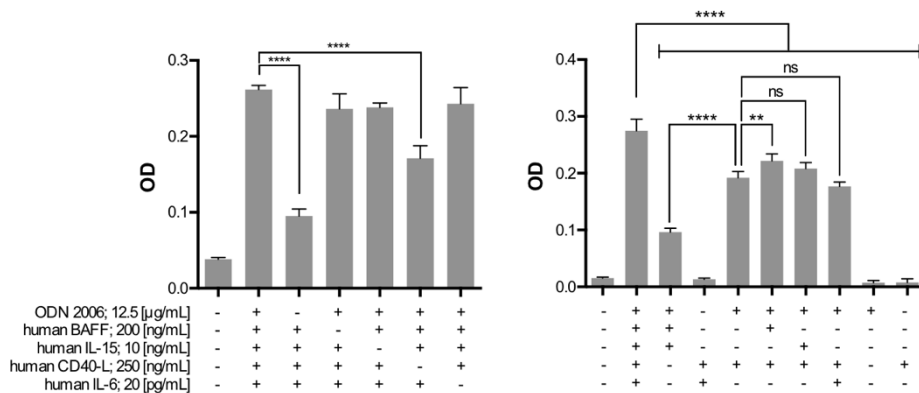


図 ODN2006、BAFF、IL-15、CD40 リガンド及び IL-6 混合刺激によるヒト B 細胞の一過性増殖条件の検討

パニング法による抗原特異的な抗体を有する B 細胞の選択を試みたが、非特異な結合性を示す抗体を有する B 細胞を排除できなかった。継続して条件検討を繰り返したが、改善には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。