

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21909

研究課題名（和文）抗体の多様性に対するシンプリシティの解明

研究課題名（英文）Elucidation of a simple role in the antibody diversity

研究代表者

白石 貢一（SHIRAIISHI, KOICHI）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40426284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：抗体の多様性は免疫における高度な防御システムであるが、合成高分子ポリエチレングリコール（PEG）誘導体により産生されるPEG特異的抗体は、PEGへの結合親和性が極めて弱いという性質を示す。この現象は極めて弱い相互作用を示すPEGが抗体の多様性に関わらず、相互作用する可能性を示唆し、PEGが近づくことができるという性質が抗体との相互作用には重要な鍵を握ると考えられる。本研究はPEGと抗PEG抗体との結合解析実験の結果、PEG分子が抗PEG IgM抗体、非特異的なIgM抗体に対して、結合親和性に大きな差がなく相互作用を示すこと、また相互作用に基づく結合という現象に差があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた結果はPEGが抗原として、特に免疫初期応答を担うIgM抗体に対して、PEG特異的抗体、および非PEG特異的抗体に作用し、その結合親和性に大きな差がないことを明らかとした。即ち、PEGのもつ他分子（抗体）へ近づけるという性質がPEGの特異性の幅の広さを示し、PEG特異的抗体産生という現象が現れやすい一つの原因を示唆していると考えられる。PEGのもつ近づけるという性質に加えて、相手となる抗体側に、より強固となる結合を補完する領域が特異的相互作用の場に存在することが重要であることを明らかとした。これは、古典的な抗体と抗原との関係を考える際に新たな視点を与えると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Diversity of antibodies is a key function for our defense system. We have found that anti-PEG antibodies (anti-PEG Abs) exhibit very weak interaction to PEG chains. This characteristic of anti-PEG Abs specific to macromolecule PEG chains indicates occurrence of PEG-related interaction to other biomolecules regardless biomolecules' specificity (especially antibodies' specificity). Our hypothesis is, firstly, that a PEG chain, as an antigen, comes close to not only PEG-specific antibodies, but also non-PEG specific antibodies. Second, owing to a characteristic of PEG's widespread specificity, part of interacted antibodies exhibit greater affinity if PEGs have possessed conjugated blocks (lipids, and proteins). We have detected that PEGs interacted to non-PEG specific IgM antibodies, as well as PEG-specific IgM antibodies. This observation have answered why PEG-related antibody responses have been frequently observed in healthy subjects and animal models.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ポリエチレングリコール 免疫原性 抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗原とは特異抗体へ結合する分子として知られている。一方、本申請者は生体親和性高分子ポリエチレングリコール (PEG) の免疫原性が PEG による特異性と PEG 近傍の結合性 (非特異的疎水性等) 部分から成立することを見出している。即ち、一般に免疫原性とは、抗原の特異性と結合性の両要素が近傍に存在する分子として成立すると考えられるが、一方で、それらは分離されることも可能であるという意味である。これまで PEG に対する抗体として抗 PEG 抗体の存在が知られてきているが、なぜ、これほど PEG に相互作用する抗体が見つかり、影響を及ぼしているのかについて、実はそれほど明らかとなっていない。我々のもつ抗体の様々な異物に対する多様性は知られている。一方、PEG に対する抗 PEG IgM 抗体応答を見てみると、第一に、同じ PEG 鎖長でも結合鎖の影響により、抗 PEG IgM 抗体飽和量が異なる。即ち、これは同じ PEG 鎖を有していても、結合鎖の違いによる結合できる PEG 受容体の総数が異なり、誘導できる抗体産生総量が異なることを示唆している。第二に、結合親和性が高い PEG 分子を用いると、血中総 IgM 量の 4-5% を抗 PEG IgM 抗体が占める。これはプラズマ細胞から産生される IgG 抗体とは異なり、B 細胞から IgM 抗体産生をする量としては極めて多い量の抗体であると考えられる。これらのことから、PEG の PEG 受容体 (抗 PEG IgM 抗体モノマー) に対する作用とは抗体の多様性を生み出す構造的要因にそれほど左右されずに、近づけることと、結合することができるという多様性とは真逆の単純な性質をもつ B 細胞受容体を選択しているのではないかと考えられる。すなわち、従来の鍵と鍵穴の関係に示される抗原と抗体の概念を大きく広げる現象を PEG は示しているのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、PEG が受容体 (抗体) 側に近づけるという性質と結合するという抗体のもつ多様性に対する単純性を解明することを目的とした。即ち、抗体側に PEG 鎖が近づける領域があること、そして PEG 鎖に結合能があり、かつ抗体鎖にも結合能があれば抗体に結合できることを明らかにする。

3. 研究の方法

抗 PEG IgM 抗体、および抗 PEG IgG 抗体を用いて、各種 PEG 鎖との相互作用を結合分析法として ELISA を用いて評価した。PEG 鎖の相互作用部位に対して交差性を示す抗原を探索することを目的に各分子を用いて評価を行った。

4. 研究成果

1) PEG 鎖の抗 PEG 抗体への相互作用について

抗 PEG IgM 抗体、および抗 PEG IgG 抗体と PEG 鎖との相互作用を評価したところ、分子量が小さな PEG 鎖 (2k-12k) ではその相互作用の強さと報告されている接触可能面積から抗体との単点での相互作用が示唆され、その表面エネルギー密度はおよそ $9\text{cal/mol}\text{\AA}^2$ であることが示唆された。一方で、PEG 鎖が長くなると多点での相互作用が示唆された。これは、同じ接触面積に対する場合、エネルギー密度が例外的に高くなりすぎることから示唆される。すなわち、分子量の大きな PEG 鎖では IgG 抗体においても、2 - 3 点で作用していると考えられる。これは抗 PEG IgG 抗体だけでなく、抗 PEG IgM 抗体でも同様であった。また、抗 PEG 抗体への結合部位付近への化学修飾を行ったが、こちらは抗体の結合能を下げるだけであり、明確な議論ができない結果となった。

2) 交換可能な PEG 鎖と抗 PEG 抗体の相互作用

抗 PEG IgM 抗体、および抗 PEG IgG 抗体に対して、多点での相互作用が可能な PEG 鎖 (MW=100k) を用いて、見かけ上の抗 PEG 抗体-PEG 複合体形成をさせ、単点で相互作用すると考えられる PEG 鎖 (MW=12k) に対して結合能を増強する分子鎖としてポリリシン鎖を導入すると、抗 PEG 抗体-PEG (100k) 複合体から、分子量が小さく、相互作用の弱い PEG (12k) 鎖を有する方に

交換が起こることが実験により確認された。この実験は PEG 鎖が抗体に近づいているだけであることを示している。

3) PEG 鎖交差性のある分子の探索

PEG 鎖に対して、交差性のある天然から合成高分子を探索したが、現状では見出すことができなかった。しかしながら、低分子において PEG 鎖と競合する分子が見出された。PEG 鎖が抗体に対して、近づくことと、結合することを実践する際に、近づく領域への交差性を示す低分子イオンは PEG と競合することから、PEG の作用先は汎用性の高い領域であることが示唆される。

4) PEG 鎖は IgM 抗体にとりわけ作用する

PEG 鎖の近づける先として、抗 PEG IgM 抗体、および抗 PEG IgG 抗体ばかりでなく、血中に存在する非免疫の正常抗体についても評価を行った。興味深いことに PEG 鎖は IgM 抗体に対して親和性を示し、その親和性は抗 PEG IgM 抗体とそれほど違いがないことが明らかとなった。両者の違いについて詳細に検討を行ったところ、PEG 鎖が近づけた後に結合できる領域がその近傍にあるかどうかの違いであることが実験から明らかとなった。

以上をまとめると、PEG 鎖が示す抗 PEG 抗体への作用先は近づきやすく、離れやすい構造的な性質であり、かつ低分子イオンが配位できる汎用的な領域であることが示唆された。この近づけるという現象には、PEG に示される特異性があるものの、選択幅の広さが示唆される。一方、結合する作用においては、近づける先である抗体側の要素の影響が大きいことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 白石貢一	4. 巻 14
2. 論文標題 分子プローブ開発の視点から見出されるポリエチレングリコール（PEG）における免疫応答	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JSMI Report 10	6. 最初と最後の頁 10-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 白石貢一	4. 巻 2
2. 論文標題 生体親和性高分子PEGの弱い相互作用とそれを起点とする生体応答の解明	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Drug Delivery System	6. 最初と最後の頁 122-130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2745/dd.37.122	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白石貢一
2. 発表標題 PEGと抗PEG抗体の関係にみえる抗体の認識と結合に関する考察
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	望月 慎一 (Mochizuki Shinichi) (10520702)	北九州市立大学・国際環境工学部・准教授 (27101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------