

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15159

研究課題名（和文）新規網羅的配列解析手法を用いた抗体レパトア総体の明示と逆遺伝学的抗体分子発現

研究課題名（英文）Explicit representation of holistic antibody repertoire by exhaustive RNA sequencing and the antibody expression by reverse genetics.

研究代表者

大西 和夫（OHNISHI, Kazuo）

国立感染症研究所・免疫部・主任研究官

研究者番号：90169011

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：次世代シーケンサーを用いて個体内で発現する抗体分子群のRNA配列を網羅的に取得し、抗体のV(D)J再構成により形成される抗原認識多様性の空間、すなわち抗体レパトア空間の全体像を可視化してその動態を記述する新規解析システムを構築した。

マウス個体内で形成される抗体レパトアの発生過程、抗原刺激による抗体レパトア動態力学の全視野的解析、新規抗体分子配列の遺伝子合成による逆遺伝学的発現とウェット実験による抗原結合性確認、レパトア形成におけるプレB細胞受容体の役割、などの研究を通して多くの重要な新知見を得た。

新興感染症に対する抗体医薬開発や新規ワクチン開発などに応用できる。

研究成果の概要（英文）：The novel system for visualization and dynamics analysis of holistic antibody repertoire space, that is generated by V(D)J-rearrangement forming the diversity of antigen recognition, by exhaustive RNA sequencing was successfully established.

The process of mouse antibody repertoire development, the response dynamics of antibody repertoire on antigen stimulation, the expression of important antibody molecules through gene-synthesis and reverse genetics, and the role of pre-B cell receptor on the repertoire formation were examined by the new system and the several important findings were obtained.

This novel analysis system is applicable for the development of antibody drugs against newly emerging infectious diseases and for planning the vaccine developments.

研究分野：免疫学

キーワード：抗体レパトア全体像 抗体レパトア発生機構 自己抗原反応レパトア 抗原応答抗体予測 抗体遺伝子合成 抗原抗体反応測定 VDJ遺伝子再構成制御 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

抗体による抗原認識は獲得免疫系の要の一つであり、病原体等外来異物に対する生体防御に中心的役割を果たす。抗体の抗原認識多様性は V(D)J 再構成がランダムに起こる事を仮定すれば 10^{10} レベルとされ、抗体レパトア全体像の把握はこれまで困難であった。しかし、近年の次世代シーケンサ技術の発展によりハイスループットの配列解析が可能となり、ヒトにおいては白血病・リンパ腫の V(D)J 配列 (Sci. Transl. Med. 1(12):12ra23 2009) やナイーブ B 細胞の Vh レパトア (Genes and Immunity 13:469-473 2012) の網羅的な解析が可能になって来ている。ヒトに比べて Vh ファミリーの多いマウスでは、汎用的な配列解析プライマーの設計が難しかったが、我々は独自の技術を開発してこの点を克服し、おそらく世界で初めて、マウス・ナイーブ B 細胞 V(D)J レパトア構成の全体像を俯瞰することに成功していた。

この方法で観測できる V(D)J レパトア配列は、フレームシフトをおこしてない productive でユニークな配列として約 10 万リードで、Vh ファミリー種としては (偽遺伝子を除く) Vh 遺伝子座全域の配列をカバーしている。配列は CH1 ドメインの一部を含んでいるので免疫グロブリン・クラス判別も可能である。1回の解析で得られる約 10 万リードの配列については質・量ともにこれまでにない大規模データとなるので、計算科学的な知識を踏まえた情報処理の方法、統計的推論の応用技術、免疫学的に理解し易い可視化技術、各配列とその翻訳産物である抗体タンパク質の立体構造を含めた免疫的な意味付けなど、新しい解析手法を開発する必要があった。

本研究は、抗体の V(D)J 再構成により形成される抗原認識多様性の空間、すなわち抗体レパトア空間の総体を可視化してその動態を解析するシステムを確立すれば、免疫学や感染症学の諸問題の解決に寄与できると考えて行われた。

2. 研究の目的

抗体分子は外来抗原を認識して排除することで生体防御に中心的役割を果たす。抗体の抗原認識多様性は V(D)J 再構成がランダムに起こる事を仮定すれば 10^{10} レベルとされ、抗体レパトア全体像の把握はこれまで困難であった。我々は、次世代シーケンサを用いた独自の手法によりマウス免疫系に発現する H 鎖および L 鎖の V 領域配列を網羅的に解析する手法を世界に先駆けて確立した。この手法によりマウス個体ごとの抗体レパトア総体とその動態を explicit に記述 (明示) する事が可能となった。さらに、取得配列を独自のアルゴリズムで解析する事により抽出した重要な挙動を示す抗体の塩基配列を遺伝子合成して抗体タンパク質を多量に発現する事にも成功しており、ドラ

イで理論的な仮説をウエットな実験で検証するシステムを確立していた。

これまでにマウスの Vh ファミリーを網羅的に解析した報告は無い。我々が開発した方法により、ヒトでは研究不可能な基礎実験すなわち、骨髄における V(D)J レパトア構築の原理、ポジティブ・ネガティブ選択の機序、末梢でのレパトア・パターン形成過程等の解析などを行う事が出来る。膨大な配列情報を免疫学的知識に基づいて解析する新しい計算分子生物学的手法の開発も必要であり、将来的に新興感染症に対する抗体医薬治療、ワクチン戦略の策定に新しい科学的根拠を与える基盤技術となりえる。具体的には以下の3項目を目的とした。

(1) 骨髄と末梢の抗体レパトアの網羅的配列解析: 骨髄における V(D)J 再構成がランダムなものでない事は我々や他のグループがすでに発見している (PNAS, 108:5348, 2011 他)。本研究では、同腹仔マウス複数個体においてレパトアを網羅的に観測し、レパトア構築の先天的な側面を明らかにすることを目的とした。抗原免疫をしていないナイーブマウスの V(D)J 再構成の偏倚パターン、末梢でのレパトア・パターン形成過程について解析する。

(2) 抗原免疫によるマウス個体内抗体レパトア総体のダイナミクスの解析: ナイーブなマウスの抗体レパトアが抗原免疫にどのように応答して抗原特異的抗体群が発生するかについて、抗体レパトア総体のダイナミクスとして解析する。重要な抗原特異的抗体分子を遺伝子合成により逆遺伝学的に発現させて抗原結合性などの特性をウエットな実験で測定する。

(3) 骨髄における V(D)J レパトア選択機序の解析: 骨髄における V(D)J 再構成を品質管理するためにプレ B 細胞受容体が働いている (蛋白質核酸酵素 47:2182-7 2002、臨床免疫・アレルギー科 49:121-127 2008)。プレ B 細胞受容体が形成されない代替鎖遺伝子欠損マウスの骨髄および脾臓における V(D)J レパトアの網羅的配列解析を行ってその偏倚の特性を掴む事により、先天的レパトア構築におけるプレ B 細胞受容体形成の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

研究の予備段階: 次世代シーケンサ (Roche 社 454 システムおよび Illumina 社 MiSeq システム) を用いた新規手法で得られる配列情報は、cDNA 上の Vh 上流非翻訳領域に始まり CH1 領域の N 末側数十塩基を含む長さで、V(D)J 配列の重複を除いたユニーク配列として約 10 万リード得られる。この約 10 万のレパトア配列を効率的に解析するバイオインフォマティクス手法を開発した。その評価方法は、各 Vh ファミリーへの分類の精度、V (D) J 再構成過程の類推、突然変異の評価 (変異点の重み付け)、配列情報の

解像度・深度などについて、既知の方法 (Nucl. Acids Res. 37, D1006-D1012 2009, Genes and Immunity 13:469-473 2012) を参考に独自に開発した。また、方法論上の制約、限界、問題点と適用範囲について検討した。例えば、配列情報の定量性の問題 (アウトプット配列の量は抗原特異的 B 細胞の数ではなく抗体 mRNA 量に依存すると考えられる) などについても適宜検討して免疫学的な解釈を与えた。本新規技術で何をどこまでどの程度の精度で測定できるかの範囲を設定した。

(1) 骨髄および脾臓の V 領域レパトアの網羅的配列解析：骨髄におけるランダムな V(D)J 配列の発生と末梢 (脾臓) における V(D)J レパトア構成の成立過程を解析した。骨髄における non-productive rearrangement 由来配列の評価が問題になるが、基本的には翻訳後アミノ酸配列が健全な免疫グロブリンドメインを持つか否かを判断基準とした。複数個体のコンジュニックマウス (C57BL/6) を用い、ランダムな V(D)J の発生、ポジティブ選択、ネガティブ選択、末梢でのレパトア・パターンの個体差 (の偏倚) を見てレパトア形成の共通点と相違点を解析した。

(2) 抗原免疫に惹起される Vh ファミリー応答パターン全体像の解析：免疫学で広く用いられる NP-CGG をモデル抗原として、抗原免疫による末梢 V(D)J 応答パターンの全体像を把握した。重要な指標となる抗体配列を遺伝子合成して抗体タンパク質を発現し、抗原反応性をウェットな実験で評価して仮説の検証を行った。

(3) 骨髄における V(D)J レパトア選択機序の解析：プレ B 細胞受容体を形成しない代替軽鎖遺伝子ノックアウトマウスにおいて、成体マウス末梢に出現する B 細胞はプレ B 細胞受容体による選択圧を受けていないと考えられている (Science. 321:696-9 2008)。代替軽鎖遺伝子ノックアウトマウスの末梢 (脾臓) における V(D)J レパトアの網羅的配列解析を行い野生型同腹仔と比較した。野生型の V(D)J レパトアはプレ B 細胞受容体による V(D)J レパトア選択圧を受けており、代替軽鎖遺伝子ノックアウトマウス末梢の V(D)J レパトアはそれを受けていない。両者の V(D)J レパトアについて数万リードの配列を比較することにより、両者の特徴的な構造を抽出して選択圧の作用機序について検討した。その過程で、B 細胞をソーティングして各種 B 細胞亜群 (胚中心 B 細胞、プラズマ細胞、記憶 B 細胞など) の V(D)J レパトアを解析してその動態を明らかにした。

動物実験に関しては、国立感染症研究所動物実験委員会の許可を得た。DNA 組換え実験に関しては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、「国立感染症研究所組換え DNA 実

験実施規則」および「国立感染症研究所バイオリスク管理委員会・病原体等安全管理規定」に従い、物理的封じ込めレベル BSL 2 で行った。

4. 研究成果

世界に先駆けて確立した次世代シーケンサを用いた独自の手法によりマウス免疫系に発現する H 鎖および L 鎖の V 領域配列を網羅的に解析する手法をさらに改良した。

(1) 骨髄および脾臓の V 領域レパトアの網羅的配列解析：次世代シーケンサを用いた新手法で得られる約 10 万の配列情報を効率的に解析するバイオインフォマティクス・パイプラインを開発・改良した (図 1)。

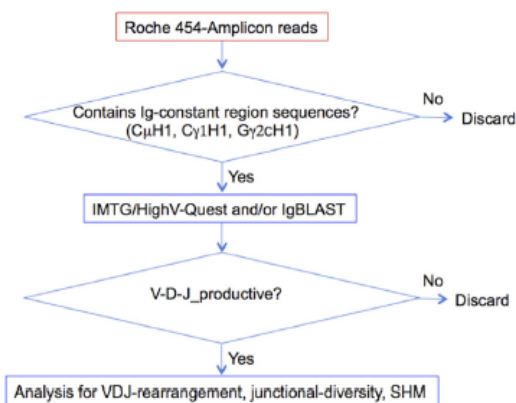


図 1：抗体レパトア解析パイプライン (文献 2)

各 Vh ファミリーへの分類の精度について Stand_alone_IgBLAST を含む新しいパイプラインを構築した。これにより高速で高精度に Vh, Jh, Dh の各配列のアノテーションができるようになった。また、体細胞突然変異 (SHM) の評価方法、V(D)J 配列の系統樹解析などについて、既知の方法を参考に独自に開発した。この方法によって得られる抗体レパトアの総体を可視化するプログラムを作成した (図 2)。

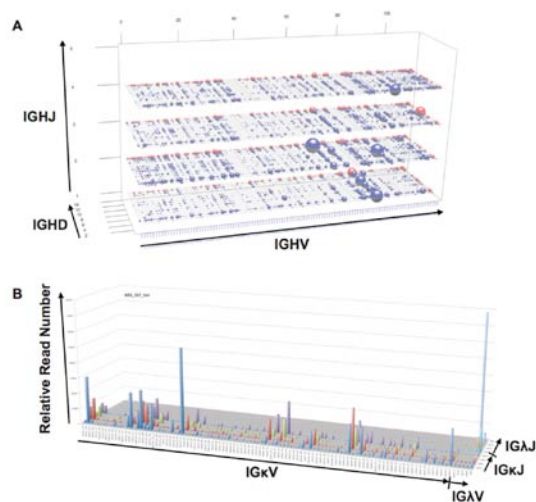


図2：抗体H鎖と抗体L鎖のレパトア総体の可視化（文献1）

① 抗体 V(D)J 領域レパトアの網羅的配列解析：骨髄における V(D)J 配列の発生と末梢（脾臓）における V(D)J レパトア構成の成立過程を解析した。骨髄における V(D)J 再構成のマウス個体間の相関性を検討した結果、高度な類似性を示したことから、骨髄における抗体レパトア発生がランダムなものではなく、ある決定論的なメカニズムにより進行することを示した。すなわち、5匹のナイーブマウスにおいて、IgM の V(D)J 再構成は均等に起こるのではなく偏倚を持って起こり、そのパターンは5匹で共通している。それに対して、クラススイッチした IgG1、IgG2c で観察される V(D)J 再構成は各マウスで個性的であった（図3）。

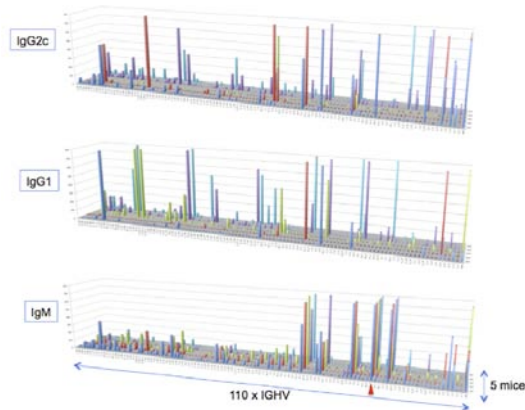


図3：ナイーブマウス5匹のIgM、IgG1、IgG2cのレパトア総体の比較（文献2）

② ノンランダム V(D)J レパトア発生機序の解析：プレB細胞受容体を形成しない代替軽鎖遺伝子欠損マウスの複数個体の骨髄および脾臓（末梢）の抗体レパトアは、野生型のレパトアとは異なるノンランダムなパターンに収束した。このことは、野生型の抗体レパトア構成にプレB細胞受容体が関与していること、しかし、プレB細胞受容体がなくとも各個体が独立に同じ V(D)J レパトア・パターンに収束することを示している。レパトア・パターンを収束させる因子が、遺伝子（抗体遺伝子座）制御であるのか、自己抗原反応抑制であるのかを今後検討する必要がある。

（2）抗原免疫に惹起される抗体レパトア総体のダイナミクスの解析：NP-CGG 抗原の免疫による末梢 V(D)J 応答パターンの全体像を把握した。複数個体のマウスで応答抗体のパターンを比較し、応答レパトアの共通成分を抽出する新規統計解析手法を確立した（図4）。この手法により、NP ハプテンに反応する Vh 遺伝子は従来知られているように Vh1-72 が優勢であり、CGG キャリアに反応する Vh は Vh9-3 が優勢であることが判明した。後者については本研究で初めて明らかにし

た。この点を確認するために、両者の V(D)J 配列を人工遺伝子合成し、それぞれ NP ハプテン、CGG キャリアとの結合性を ELISA 法で測定した。その結果、Vh1-72 は NP と結合し、Vh9-3 は CGG キャリア結合することが確認された。このことから、本手法によりレパトア総体の抗原応答ダイナミクスを数理的に解析により、応答抗体レパトアを同定する手法が有用性であることが確認された（図5）。特に、この解析により、異なるマウス個体で CDR3 領域を含む全く同じ抗体 V(D)J 配列が複数発生し、NP-CGG 抗原で淘汰されてくることが観察されたことは初めての知見であり、抗原による抗体レパトア駆動の動態を知る上で重要な手がかりを与えるものと考え（図6）。

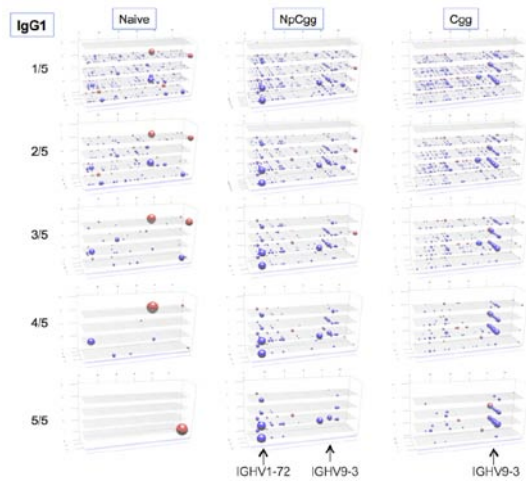


図4：抗原（NP-CGG, CGG）に反応するレパトアの抽出。5/5 は5匹のマウスに共通して誘導される V(D)J 配列を表す（文献2）。

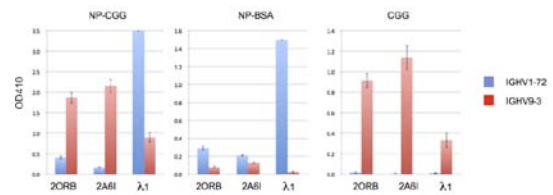


図5：Vh1-72 および Vh9-3 抗体の配列を遺伝子合成して発現させた抗体による ELISA テスト。それぞれ NP と CGG に結合した（文献2）。

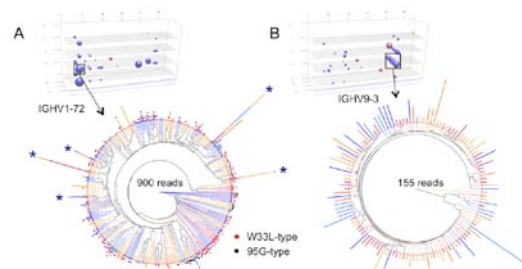


図6：Vh1-72 抗体と Vh9-3 抗体の分子系統解析。星印は複数のマウス個体に共通して出現した V(D)J 配列の位置とその頻度を示す（文

献 2)。

(3) 骨髄における V(D)J レパトア選択機序の解析: プレ B 細胞受容体を形成しない代替軽鎖遺伝子ノックアウトマウス (Lambda5-KO) における V(D)J レパトアの網羅的配列解析を行いそのパターンを野生型同腹仔と比較した。プレ B 細胞受容体を形成しない代替軽鎖遺伝子欠損マウスの複数個体の骨髄および脾臓 (末梢) の抗体レパトアは、野生型のレパトアとは異なるノンランダムなパターンに収束した (図 7)。このことは、野生型の抗体レパトア構成にプレ B 受容体が関与していること、しかし、プレ B 細胞受容体がなくても各個体が独立に同じ V(D)J レパトア・パターンに収束することを示している。

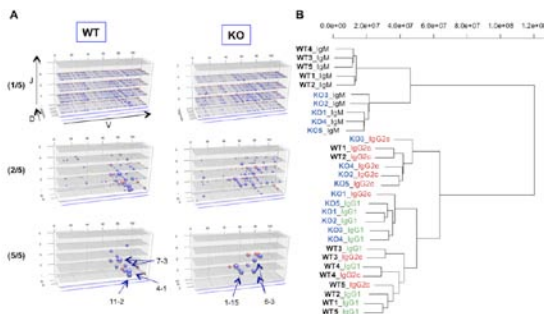


図 7 : プレ B 細胞受容体欠損マウスと野生型マウスの抗体レパトア比較。形成されるレパトア・パターンは異なる (文献 1)。

さらに、両者の骨髄レパトアの CDR3 配列を比較した結果、プレ B 細胞受容体欠損マウスの CDR3 は特徴的な物理化学的性質を持つことが主成分分析により明らかになった (図 8)。この特徴は、CDR3 ループ中のアルギニンの位置と数に依存し、ポリリアクティブな自己抗体の性質を有する可能性が高い。すなわち、プレ B 細胞受容体の機能の一つとして、自己抗体生成の排除が考えられた。

WT1	WT2	WT3	WT4
GARDNWDYFDW 1.1%	GARDNWDYFDW 13.2%	CAILDYDFYFDW 2.8%	GARDNWDYFDW 2.7%
CARDQDWFYFDW 0.7%	CASNYWYFDW 4.5%	CARCQYDFYFDW 1.9%	CARDQDWFYFDW 2.2%
GARDNWDYFDW 0.8%	GARSDYDFYFDW 1.9%	CARGSDYDFYFDW 1.8%	CARDYDFWYFDW 3.0%
CTDGLAFYDFYFDW 0.3%	CAREEDWYFDW 1.4%	CARFYDFYFDW 1.4%	CARDNWDYFDW 0.5%
CARRYSDFYFDW 0.2%	CARGDQYDFYFDW 1.1%	CARDLYDFYFDW 0.9%	CARDQDYDFYFDW 0.9%
GASQNYW 0.2%	CARDQDWFYFDW 0.7%	CTDYSYDFYFDW 0.8%	CARGDYGAMDFW 0.7%
CARDQDWFYFDW 0.2%	CARDNWDYFDW 0.6%	CARDQYDFYFDW 0.7%	CARDNWDYFDW 0.6%
CARDQDWFYFDW 0.2%	CARDNWDYFDW 0.4%	CARDNWDYFDW 0.3%	CARDQDWFYFDW 0.3%
CARAFYDFYFDW 0.2%	CARDNWDYFDW 0.4%	CARDNWDYFDW 0.3%	CARDQDWFYFDW 0.3%
CARAFYDFYFDW 0.2%	CARDQDWFYFDW 0.3%	CARDQDWFYFDW 0.3%	CARDQDWFYFDW 0.3%

KO1	KO2	KO3	KO4
CTTDFW 01.3%	CARDYDFYFDW 10.2%	CARDGTLNLDYDFYFDW 17.2%	CTTDFW 10.2%
CARDYDFW 2.6%	CARDGSDYFDW 12.2%	CARCYNDFYFDW 7.6%	CARDITVATLYFYFDW 10.1%
CTTDFW 2.2%	CARDNWDYFDW 2.9%	CARDNWDYFDW 4.7%	CARDGTFDFW 5.8%
CARDQDWFYFDW 1.7%	CARDNWDYFDW 2.9%	CARDQDWFYFDW 3.0%	CARDQDWFYFDW 5.1%
CTRAGDQDFW 1.3%	CARDNWDYFDW 1.9%	CTRLDFW 2.9%	CARDQDWFYFDW 4.5%
CARDNWDYFDW 1.0%	CARDNWDYFDW 1.4%	CARDNWDYFDW 2.3%	CARDQDWFYFDW 2.9%
CARDNWDYFDW 0.9%	CARDNWDYFDW 1.4%	CARDNWDYFDW 1.9%	CARDQDWFYFDW 2.7%
CARDQDWFYFDW 0.7%	CARDNWDYFDW 1.4%	CTTDFW 1.8%	CARDNWDYFDW 2.5%
CARDQDWFYFDW 0.6%	CARDNWDYFDW 1.4%	CARDNWDYFDW 1.7%	CARDQDWFYFDW 2.4%
CTTDFW 0.5%	CARDNWDYFDW 1.2%	CARDNWDYFDW 1.7%	CARDQDWFYFDW 2.2%

Arginine (R) are highlighted in blue color.

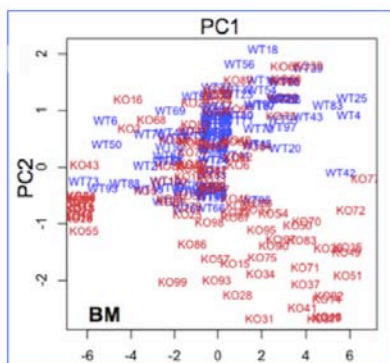


図 8 : プレ B 細胞受容体欠損マウスと野生型マウスの骨髄レパトアにおける CDR3 配列の比較。両者の物理化学的性質は分離することが主成分分析 (下図) により示され、アルギニンの位置と数が両者で大きく異なることが明らかになった (上図)。(文献 1)

本研究で、我々が新規に確立した網羅的抗体レパトア解析手法、抗原応答レパトアを検出する新規統計手法、抗原応答抗体レパトア遺伝子の人工合成と発現による抗原結合性の解析手法の有用性が確認された。この新規解析システムは、新興感染症に対する抗体医薬開発や新規ワクチン開発などに応用できる。今後、ヒト抗体レパトア解析手法への移行を急ぎ、感染症対策に実用化できるよう研究を推進する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

① Lin Sun, Naoko Kono, Takeyuki Shimizu, Hiroyuki Toh, Hanbing Xue, Osamu Numata, Manabu Ato, Shigeyuki Itamura, Kazuo Ohnishi. "Distorted antibody repertoire developed in the absence of pre-B cell receptor formation" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 495: 1411-1417 (2018)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.171

② Naoko Kono, Lin Sun, Hiroyuki Toh, Takeyuki Shimizu, Hanbing Xue, Osamu Numata, Manabu Ato, Kazuo Ohnishi, Shigeyuki Itamura, "Deciphering antigen responding antibody repertoires by using next-generation sequencing and confirming them through antibody gene synthesis" *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (査読有) 487:300-306 (2017)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.054

[学会発表] (計 5 件)

① XUE Hanbing, OHNISHI Kazuo, Examination of "Universal Light Chain" models that can be paired with a wide spectrum of immunoglobulin heavy chains maintaining their antigen-binding specificities
第 4 6 回日本免疫学会 2017 年

② SUN Lin, OHNISHI Kazuo, "Next Generation Sequencer Analysis of B cell Repertoires in λ5-deficient mice"
第 4 5 回日本免疫学会 2016 年

③ XUE Hanbing, SUN Lin, OHNISHI Kazuo, "Designing of 'Universal Light-Chain', that might be able to associate with a wide

spectrum of heavy-chains maintaining their antigen-binding specificity”
第45回日本免疫学会 2016年

④ 藤 博幸, 大西和夫
代替L鎖の分子系統解析
第16回日本蛋白質科学会年会 (2016)
福岡国際会議場

⑤ Miyaki, R., Toh H., Ohnishi, K.
Generation of Amino Acid Indices to Distinguish Two Peptide Groups
CBI学会2016年大会 (2016)

[その他]

ホームページ等

「免疫機能に関する研究：抗体産生B細胞の発生・分化機構に関する研究」

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/lab/475-imm/938-imm-ko.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 和夫 (OHNISHI Kazuo)
国立感染症研究所・免疫部・主任研究官
研究者番号：90169011

(2) 研究分担者

籾 博幸 (TOH Hiroyuki)
関西学院大学・理工学部・教授
研究者番号：70192656

野口 保 (NOGUCHI Tamotsu)
明治薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：00357740

藤本 浩文 (FUJIMOTO Hirohumi)
国立感染症研究所・品質保証管理部・室長
研究者番号：60373396