

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05231

研究課題名（和文）抗原レセプターの抗原親和性に依存したシグナル伝達調節の解明と抗体作製技術への応用

研究課題名（英文）Antigen affinity-dependent regulation of B cell antigen receptor signaling

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学域・准教授

研究者番号：70304334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：抗体遺伝子への自発的な変異能力を有するニワトリB細胞株DT40を利用して、生体内抗体産生系を模倣したin vitro抗体作製技術を構築してきた。その過程で、抗原レセプターへの抗原結合の親和性に依存して、惹起されるシグナル強度に応じて発現レベルが変化する遺伝子があることを見出した。本研究では、抗原レセプターと抗原との親和性に依存した発現を示す遺伝子を見出し、その発現を調節していると想定される親和性に依存したシグナル機構を見出した。これらを応用して抗原レセプターシグナルの強度を細胞生存シグナルの強度に変換し、生体内での高親和性抗体の効率的な選択機構を模倣する技術が開発可能であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、B細胞の抗原レセプターシグナル伝達系が抗原との親和性の強弱を区別する機構に関して重要な知見となる。また、本研究の成果は、こうした生体内の高親和性抗体産生機構の理解だけでなく、効率的な抗体作製技術の開発にも重要である。

研究成果の概要（英文）： Using the chicken B cell line DT40, which has the ability to spontaneously mutate to antibody genes, we have been constructing an in vitro antibody generation technology that mimics an in vivo antibody generation system. In the course of this work, we found that there are genes whose expression levels change in response to the signal intensity elicited, depending on the affinity of antigen binding to the antigen receptor. In this study, we found genes whose expression depends on the affinity between the antigen receptor and the antigen, and affinity-dependent signaling mechanisms that are assumed to regulate their expression. By applying these findings, we believe that it is possible to develop a technology to convert the intensity of antigen receptor signals into the intensity of cell survival signals and to mimic the efficient selection mechanism of high affinity antibodies in vivo.

研究分野：細胞工学

キーワード：抗体 親和性成熟 抗原受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-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分子標的治療薬として活用されてきている。動物生体内の抗体産生系では、標的抗原に特異的な抗体の親和性は時間と共に上昇していく。この親和性成熟という過程は、抗原結合に関わる抗体可変部への変異による変異体ライブラリー形成と親和性が向上した変異抗体の選択によって起こる。この生体内の抗体産生過程を模倣した *in vitro* 抗体作製技術が多く考案されている。しかし、抗体ライブラリー形成は模倣できていても、生体内の選択過程を模倣した抗体作製技術は確立されていない。

申請者は、抗体遺伝子に高頻度突然変異を自発的に起こすニワトリ B 細胞株 DT40 に注目し、革新的な *in vitro* 抗体作製技術をこれまでに構築した(図1)(1, 2)。さらに、DT40 細胞の変異能力が外来遺伝子の改変に有効であることを見だし(3)、DT40 細胞の抗体可変部遺伝子を任意の目的抗体遺伝子に置換して、DT40 細胞の変異能力により親和性成熟させる技術を開発した。その過程で、DT40 細胞の抗体遺伝子変異機構の操作によって変異能力を 3 倍以上に向上させ、質の高い抗体ライブラリー作製を可能にする技術開発にも成功している(4-7)。

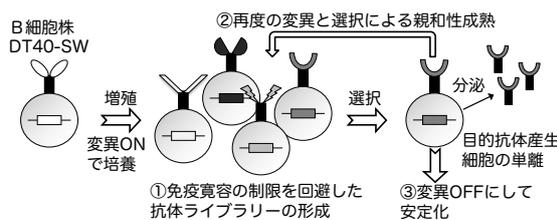


図1 DT40-SWを用いた *in vitro* 抗体作製システムと有用性

In vitro 抗体作製技術における抗体ライブラリーからの抗原結合クローンの単離は、抗原と抗体の結合のみを指標としている。この原理ではライブラリー中での頻度の高い低親和性抗体が優先的に単離され、低頻度でしか存在しない有用な高親和性抗体の取得効率は低く偽陽性も顕著である。低頻度の有用抗体をライブラリーから効率よく単離する技術の開発は、DT40 細胞用いた技術だけでなくファージディスプレイ法も含めた *in vitro* 抗体作製技術に共通する重要課題である。

生体内の抗体産生系では 10 億種類ともいわれる抗体レパートリーの中から、わずかしかな存在しない抗原特異的抗体が超高効率に選択される。我々が構築した特定の抗原特異的を有する DT40 細胞株を用いて抗原レセプターシグナルを調査したところ、抗原との親和性に依存して抗原レセプターシグナル誘導性遺伝子発現が増強することを見いだした。親和性に依存した抗原レセプターシグナル調節を明らかにすることは、生体内の高親和性抗体産生機構の理解だけでなく、効率的な抗体作製技術の開発にも重要である。

2. 研究の目的

本研究では、B 細胞の抗原認識機構について、これまでの定説にはない抗原親和性に基づいた抗原レセプターシグナル調節機構を明らかにする。さらに、抗原レセプターシグナルを細胞の生存シグナルに変換する機構を組み込んだ DT40 細胞を樹立して、超高効率な生体内の抗体選択系を模倣した *in vitro* 抗体作製技術を確立する。

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。DT40 細胞は相同組換え効率が例外的に高く、細胞の分子育種に非常に適している。これまでに、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(2)、抗体作製技術を開発した(1)。抗体変異導入機構についても多くの知見を得ている(4-6, 8, 9)。本研究では、抗原レセプターへの刺激強度に依存して転写因子 NR4A1 (nuclear receptor 4A1) が発現誘導

されることを見いだした予備データに基づいて、NR4A1 の発現調節機構を明らかにするとともに、同様な様式で抗原刺激強度に依存して発現が惹起される遺伝子を探索し、その遺伝子発現にいたるシグナル伝達経路を解析した。

(1) 抗原レセプターへの刺激強度の違いによる NR4A1 発現機構の解析

NR4A1 の発現の経時変化や抗原濃度依存性を詳細に調査する。さらに、抗原レセプター下流のどのシグナル伝達経路を使用しているかを、シグナル因子のノックアウト DT40 細胞や特異的阻害剤を用いて探索した。

(2) 抗原レセプターの抗原への刺激強度の違いに応答して誘導される因子の探索

公的データベース上にある、DT40 細胞を用いた抗原レセプター刺激の有無でのトランスクリプトーム解析データを利用して、抗原レセプターシグナル強度に依存した発現を示す遺伝子の絞り込みをし、抗原レセプターへのシグナル強度に発現強度が依存する遺伝子を選抜する。シグナル伝達経路の解析を行った。抗原レセプターへの刺激強度の違いが発現量の差異として大きく現れる遺伝子を選び、レポーター遺伝子による高感度検出の方法を検討した。

4. 研究成果

(1) 抗原レセプターへの刺激強度の違いによる NR4A1 発現機構の解析

抗原レセプター刺激に依存して誘導される NR4A1 (nuclear receptor 4A1) の転写について、各種シグナル因子のノックアウト DT40 細胞や各因子の特異的阻害剤を用いて探索した結果、特に Ca²⁺イオンをセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達経路が、DT40 細胞における NR4A1 の転写誘導に重要であることを見出した。Ca²⁺イオンをセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達経路の下流シグナル経路について各種阻害剤を用いて詳細に解析した。DT40 細胞の NR4A1 発現は、カルシウムシグナルのうち、CaMK 経路には依存せず、カルシニューリンと PKC の経路に依存していることが明らかになった。NR4A1 の転写に必要なシグナル経路について、プロモーターに蛍光タンパク質遺伝子を連結したレポーターを用いてシグナル伝達経路について探索した。その結果、カルシニューリンだけでなく PKC 下流の MAPK 経路も関与していることが明らかになった。また、DT40 細胞において再現性よくプロモーター活性を観察できるようにレポーター遺伝子の導入方法を検討し、OVA 遺伝子座への組み込みが適していることを見出した。プロモーターの転写調節領域の各種調節モチーフに変異を導入したレポーター遺伝子を作製して、プロモーターに活性化シグナルを伝える経路について検討したところ、MEF に結合するモチーフが B 細胞株における NR4A1 の転写調節において重要は役割を果たしていることが明らかになった。特にこの領域は、転写の活性化だけでなく、無刺激状況下での転写の抑制にも寄与していることがわかった。この部分をタンデムに連結させると遺伝子発現が増強されることから、これらの領域の操作によって NR4A1 のレポーター活性を改良できると考えられる。このレポーターを用いて抗原レセプターの刺激強度の違い、すなわち抗原への親和性の違いを認識できるレポーターを構築できると考えられる。

(2) 抗原レセプターの抗原への刺激強度の違いに応答して誘導される因子の探索

抗原レセプター刺激に依存して発現される遺伝子について、公的データベース上の DT40 細胞を用いた関連研究のトランスクリプトーム解析データを利用して、抗原レセプターシグナル強度に依存した発現を示す遺伝子の絞り込みをし、データベース上で抗原レセプター刺激強度に発現誘導していることが想定されるいくつかの遺伝子について、本研究の実験系においても検証したところ、これら遺伝子が抗原刺激の強度に依存して発現誘導される候補遺伝子であること

を見出した。さらに、これらの多くは、NR4A1 と同様に Ca²⁺イオンをセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達経路に依存していた。その下流経路は遺伝子によって異なっているだけでなく、抗原レセプターの刺激強度の違いによっても用いるシグナル経路の寄与が変化することを見出した。これをさらに解析することにより、B細胞による抗原の親和性認識に関する分子機構を明らかにできると考えられる。さらに、その知見を応用すれば、抗原親和性を高感度に認識できるレポーターを構築できると考えられる。

1. Todo, K., Miyake, K., Magari, M., Kanayama, N., and Ohmori, H. (2006) Novel in vitro screening system for monoclonal antibodies using hypermutating chicken B cell library *Journal of Bioscience and Bioengineering* **102**, 478-481 10.1263/jbb.102.478
2. Kanayama, N., Todo, K., Reth, M., and Ohmori, H. (2005) Reversible switching of immunoglobulin hypermutation machinery in a chicken B cell line *Biochemical and Biophysical Research Communications* **327**, 70-75 10.1016/j.bbrc.2004.11.143
3. Kanayama, N., Todo, K., Takahashi, S., Magari, M., and Ohmori, H. (2006) Genetic manipulation of an exogenous non-immunoglobulin protein by gene conversion machinery in a chicken B cell line *Nucleic Acids Research* **34**, 10.1093/nar/gnj013
4. Magari, M., Kanehiro, Y., Todo, K., Ikeda, M., Kanayama, N., and Ohmori, H. (2010) Enhancement of hypermutation frequency in the chicken B cell line DT40 for efficient diversification of the antibody repertoire *Biochemical and Biophysical Research Communications* **396**, 353-358 10.1016/j.bbrc.2010.04.096
5. Kajita, M., Okazawa, T., Ikeda, M., Todo, K., Magari, M., Kanayama, N. *et al.* (2010) Efficient affinity maturation of antibodies in an engineered chicken B cell line DT40-SW by increasing point mutation *Journal of Bioscience and Bioengineering* **110**, 351-358 10.1016/j.jbiosc.2010.03.006
6. Kajita, M., Magari, M., Todo, K., Kanayama, N., and Ohmori, H. (2010) Conditional transformation of immunoglobulin mutation pattern from gene conversion into point mutation by controlling XRCC3 expression in the DT40 B cell line *Journal of Bioscience and Bioengineering* **109**, 407-410 10.1016/j.jbiosc.2009.09.050
7. Kanehiro, Y., Todo, K., Negishi, M., Fukuoka, J., Gan, W., Hikasa, T. *et al.* (2012) Activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation requires a splice isoform of the serine/arginine-rich (SR) protein SRSF1 *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 1216-1221 10.1073/pnas.1120368109
8. Kawaguchi, Y., Nariki, H., Kawamoto, N., Kanehiro, Y., Miyazaki, S., Suzuki, M. *et al.* (2017) SRSF1-3 contributes to diversification of the immunoglobulin variable region gene by promoting accumulation of AID in the nucleus *Biochemical and Biophysical Research Communications* **485**, 261-266 10.1016/j.bbrc.2017.02.097
9. Kumar Singh, A. a. T. A. a. J. A. a. K. N. a. A. A. a. T. P. a. K. P. (2019) Splicing regulator SRSF1-3 that controls somatic hypermutation of IgV genes interacts with topoisomerase 1 and AID. *Molecular Immunology* **116**, 63-72 10.1016/j.molimm.2019.10.002 , pmid = 31622795

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Magari Masaki, Nishioka Miku, Hari Tomomi, Ogawa Sayaka, Takahashi Kaho, Hatano Naoya, Kanayama Naoki, Futami Junichiro, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 596
2. 論文標題 The immunoreceptor SLAMF8 promotes the differentiation of follicular dendritic cell dependent monocytic cells with B cell activating ability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2659 ~ 2667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14468	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 Kaneshige Riku, Ohtsuka Satomi, Harada Yuhei, Kawamata Issei, Magari Masaki, Kanayama Naoki, Hatano Naoya, Sakagami Hiroyuki, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 289
2. 論文標題 Substrate recognition by Arg/Pro rich insert domain in calcium/calmodulin dependent protein kinase kinase for target protein kinases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 5971 ~ 5984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16467	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 Ohtsuka Satomi, Okumura Taisei, abuchi Yuna, Miyagawa Tomoyuki, Kanayama Naoki, Magari Masaki, Hatano Naoya, Sakagami Hiroyuki, Suizu Futoshi, Ishikawa Teruhiko, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Conformation-Dependent Reversible Interaction of Ca ²⁺ Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase with an Inhibitor, TIM-063	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 545 ~ 553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.1c00796	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 Fukumoto Yusei, Harada Yuhei, Ohtsuka Satomi, Kanayama Naoki, Magari Masaki, Hatano Naoya, Sakagami Hiroyuki, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 587
2. 論文標題 Oligomerization of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase kinase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 160 ~ 165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.11.105	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 Yamamoto Maho, Kondo Rina, Hozumi Haruka, Doi Seita, Denda Miwako, Magari Masaki, Kanayama Naoki, Hatano Naoya, Morishita Ryo, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification and Biochemical Characterization of High Mobility Group Protein 20A as a Novel Ca ²⁺ /S100A6 Target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 510 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom11040510	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 Doi Seita, Fujioka Naoki, Ohtsuka Satomi, Kondo Rina, Yamamoto Maho, Denda Miwako, Magari Masaki, Kanayama Naoki, Hatano Naoya, Morishita Ryo, Hasegawa Takafumi, Tokumitsu Hiroshi	4. 巻 96
2. 論文標題 Regulation of the tubulin polymerization-promoting protein by Ca ²⁺ /S100 proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102404 ~ 102404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2021.102404	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 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 安福 希, 伊藤 雄大, 小野 和奏, 大塚 里美, 曲 正樹, 波多野 直哉, 徳光 浩, 金山 直樹
2. 発表標題 B細胞抗原レセプターシグナル誘導性分子の発現に必要なシグナル伝達経路
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 雄大, 野田 凌太郎, 長門 直希, 安福 希, 大塚 里美, 曲 正樹, 波多野 直哉, 徳光 浩, 金山 直樹
2. 発表標題 抗原レセプターシグナル依存的に発現するオーファンレセプターNR4A1のB細胞における発現制御機構の解明
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大森 晴斗 , 秋山 美咲 , 道廣 志龍 , 大塚 里美 , 曲 正樹 , 波多野 直哉 , 徳光 浩 , 金山 直樹
2. 発表標題 Src family kinase阻害剤感受性因子によるAID発現制御機構の解明
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 在間 郁治 , 石橋 朋之 , 成木 弘明 , 川口 佑加 , 河本 奈緒子 , 横山 和輝 , 市川 千紗 , 大塚 里美 , 曲 正樹 , 波多野 直哉 , 徳光 浩 , 金山 直樹
2. 発表標題 抗体遺伝子高頻度突然変異におけるスプライシング因子SRSF1の機能部位
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤雄大 , 野田凌太郎 , 長門直希 , 曲正樹 , 波多野直哉 , 徳光浩 , 金山直樹
2. 発表標題 抗原レセプターシグナル依存的に発現するオーファンレセプターNR4A1のB細胞における発現制御機構の解明
3. 学会等名 第62回_日本生化学会 中国_四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 在間郁治 , 石橋朋之 , 成木弘明 , 川口祐加 , 曲正樹 , 波多野直哉 , 徳光浩 , 金山直樹
2. 発表標題 抗体遺伝子高頻度突然変異におけるSRSF1-3の機能部位の特定
3. 学会等名 第62回_日本生化学会 中国_四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森晴斗, 秋山美咲, 梶浦雄也, 石橋朋之, 久原亜弓, 大柳昇, 曲正樹, 波多野直哉, 徳光浩, 金山直樹
2. 発表標題 転写および翻訳段階におけるAID発現調節機構の解析
3. 学会等名 第62回_日本生化学会 中国_四国支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安福 希、曲 正樹、波多野 直哉、徳光 浩、金山 直樹
2. 発表標題 B細胞抗原レセプターシグナル強度に依存して誘導される分子の探索
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山 美咲、大森 晴斗、梶浦 雄也、石橋 朋之、久原 亜弓、曲 正樹、波多野 直哉、徳光 浩、金山 直樹
2. 発表標題 BCRシグナル伝達因子LynによるAID発現制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田凌太郎, 曲 正樹, 徳光 浩, 金山直樹
2. 発表標題 抗原レセプターシグナル依存的に発現するオーファンレセプターNR4A1のB細胞における発現制御機構の解明
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長門 直希, 伊藤 雄大, 野田 凌太郎, 金山 直樹
2. 発表標題 抗原レセプターシグナル依存的に発現するオーファンレセプター NR4A1 の B 細胞における発現制御機構の解明
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野 和奏, 安福 希, 伊藤 雄大, 金山 直樹
2. 発表標題 抗原刺激強度依存的な遺伝子発現における BCR シグナル経路の役割
3. 学会等名 日本生物工学会西日本支部大会2023
4. 発表年 2023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

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