

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07009

研究課題名(和文) 免疫刺激によるシングルドメイン抗体の親和性成熟と抗原抗体複合体の物性変化の解明

研究課題名(英文) Affinity maturation and property changes of single-domain antibodies through repeated immunizations.

研究代表者

赤澤 陽子 (Akazawa, Yoko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：50549897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラクダ科動物由来シングルドメイン(VHH)抗体の効率的な取得を目指して、アルパカへの抗原免疫と次世代シーケンサー解析を組み合わせた「抗体配列進化追跡法」を開発しました。本研究では、アルパカに複数回の抗原を免疫し、VHH抗体配列の経時的なレパトア解析を実施し、本スクリーニング法によって選抜したあるクラスターのVHH抗体群の物性評価(抗原結合能や熱安定性)を解析した結果、免疫刺激による抗体成熟に伴い抗原結合能が上昇する一方で、熱安定性の低下傾向を認めました。この「抗体配列進化追跡法」は抗原に結合するVHH抗体や物性予測に活用でき、VHH抗体の治療・診断用医薬や素材開発につながると期待しております。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体蛋白質において、免疫過程の体細胞変異によるアミノ酸配列の変化に伴って抗原との結合がどのように変化しているかを物性解析により明らかにすることで、抗体産生における生物の巧妙な戦略を理解でき、さらに抗体医薬開発の基礎的な知見になり得る。

研究成果の概要(英文)：To efficiently obtain camelid-derived single-domain (VHH) antibodies, we have developed an "antibody sequence evolution tracking method" that combines antigen immunization of alpacas with next-generation sequencing analysis. In this study, we immunized alpacas with antigen multiple times and performed a lepatore analysis of VHH antibody sequences over time. As a result of analyzing the physical properties (antigen-binding capacity and thermal stability) of a cluster of VHH antibodies selected by this screening method, we found that antigen-binding capacity increased with antibody maturation due to immune stimulation, while thermal stability showed a decreasing trend. This "antibody sequence evolution tracking method" can be utilized to predict VHH antibodies that bind to antigens and their physical properties, and is expected to lead to the development of VHH antibodies for therapeutic and diagnostic drugs and materials.

研究分野：抗体工学

キーワード：抗体 抗原結合能 熱安定性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫刺激による抗体産生機構の研究は古くから活発に行われている一方で、焦点は免疫学的機構や親和性成熟に当てられており蛋白質工学的な視点での研究は少ない。IgG 抗体は軽鎖と重鎖の組合せを考慮する必要があり、経時的な体細胞変異を解析するのは非常に難しく複雑であるが、VHH 抗体を利用することで組合せの考慮はなくなり解析が各段に容易となる。特に、独自の「抗体配列進化追跡法」により、1つのクラスターに属する多数の抗体配列を取得しており、これらを時系列に比較することでアミノ酸変異の物性影響を包括的に評価できると考えた。

2. 研究の目的

抗原免疫刺激による VHH 抗体の体細胞変異によるアミノ酸配列の変化に伴い、抗原との結合や抗体の物性がどのように変化しているかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

アルパカに抗原を2週間おきに6回免疫し、免疫前から毎週15回採血を行った。採血サンプルから VHH 抗体の部分で NGS 解析用のライブラリーを作製し、MiSeq (illumina 社) を用いて配列解析をおこなった。得られた配列データを「抗体配列進化法」によりスクリーニングを実施し、本研究に使用するクラスター(類似のアミノ酸配列の集団)を得た。免疫刺激による抗体安定性への影響を評価するために、クラスターから異なる出現時期の VHH 抗体配列を選出した。免疫初期 10 配列、免疫中期 20 配列、免疫後期 20 配列の VHH 抗体を人工遺伝子合成により作製し、pAED4 ベクターにのせかえて大腸菌で発現・精製をおこなった。各 VHH 抗体について抗原親和性 (Biacore: 分子間相互作用解析) 熱安定性 (DSF: differential scanning fluorimetry 解析) 酸・アルカリ耐性 (円偏光二色性(CD)や ELISA) について検討を行った(図1)。

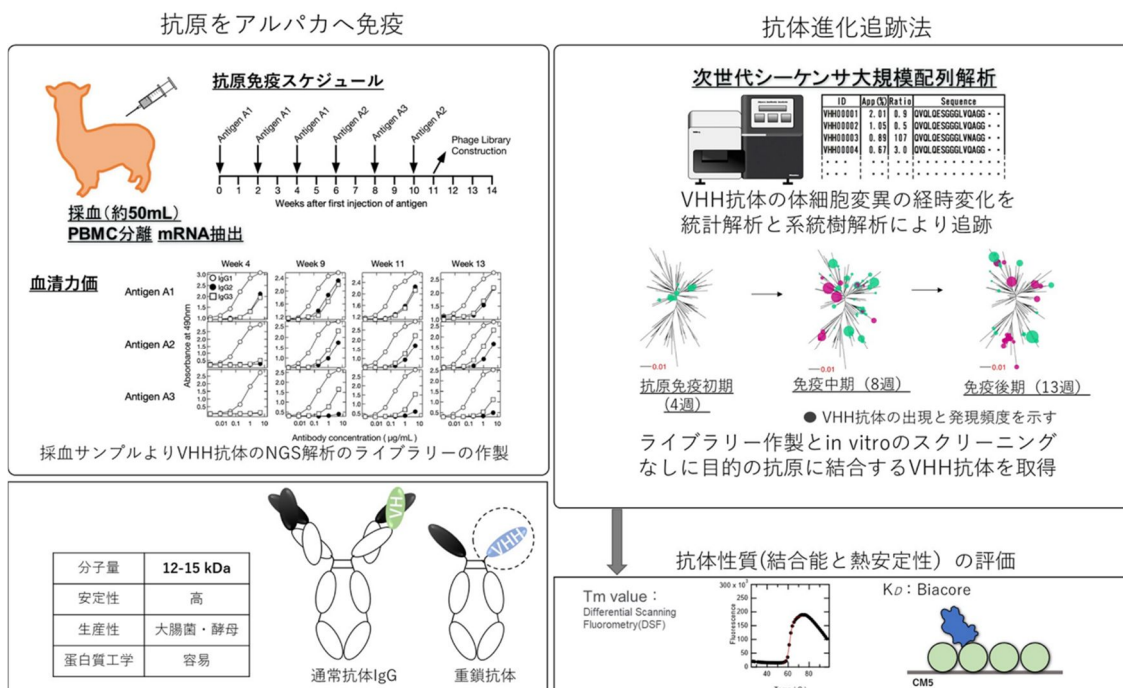


図1 研究の方法

4. 研究成果

(1) 抗体進化追跡法により選出した系統樹

スクリーニングにより得られた抗原に結合するクラスターの1つを選び、1、4、6、8、13週における出現した抗体と発現頻度について示した。緑の○は Long Hinge 由来、赤の○は Short Hinge 由来の抗体を示している。○の大きさは発現頻度である(図2A)。1週目の採血ではこの系統樹に出現している抗体は認められなかったが、4週で系統樹の中心に出現があり、採血週が進むにつれて出現する抗体が系統樹の端に推移することを認めた。図2Bはこのクラスターの由来するゲノム配列から変異挿入により配列がかけ離れてきている様子を数値化したものである。BitScore 値が高いほどゲノム配列と似ており、免疫が進むにつれてゲノム配列から変異が蓄積し、負の傾きになる。本研究で作製した免疫初期 10 配列、免疫中期 20 配列、免疫後期 20 配列の VHH 抗体の系統樹上の位置を図2Cに示した。

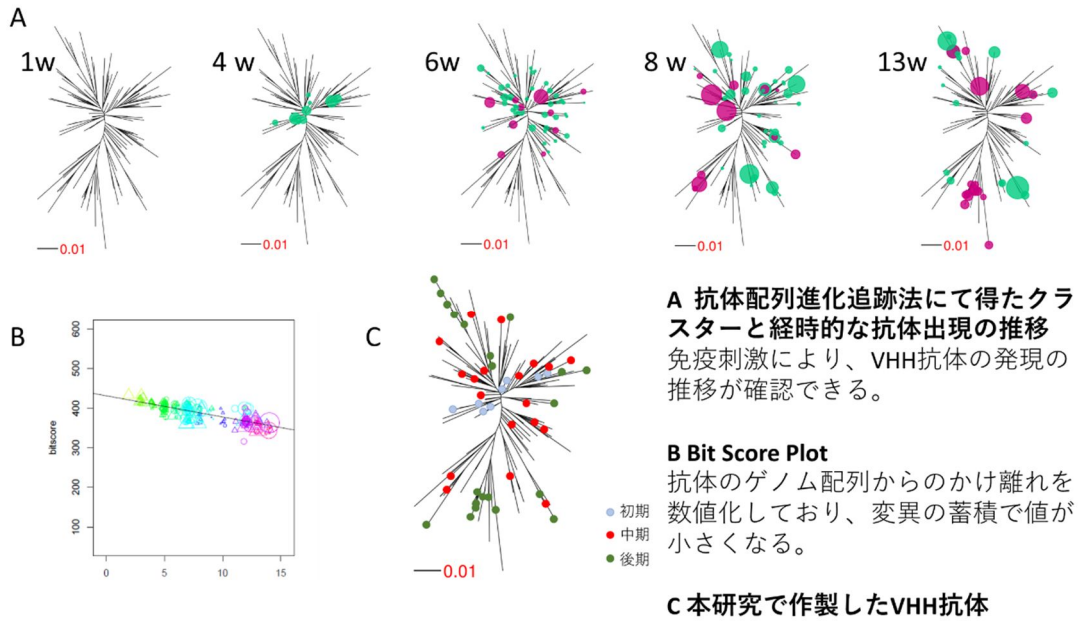


図2 抗体進化追跡法で得られた系統樹および BitscorePlot

(2) 作製した VHH 抗体のアミノ酸配列と変異の推移

作製した VHH 抗体のアミノ酸配列をアライメントしたのが図 3 である。免疫初期配列の一つである L_3037 と比較して、免疫初期では CDR2 に変異挿入が多く、中期では CDR1 へ後期では FR の変異挿入が確認できた。

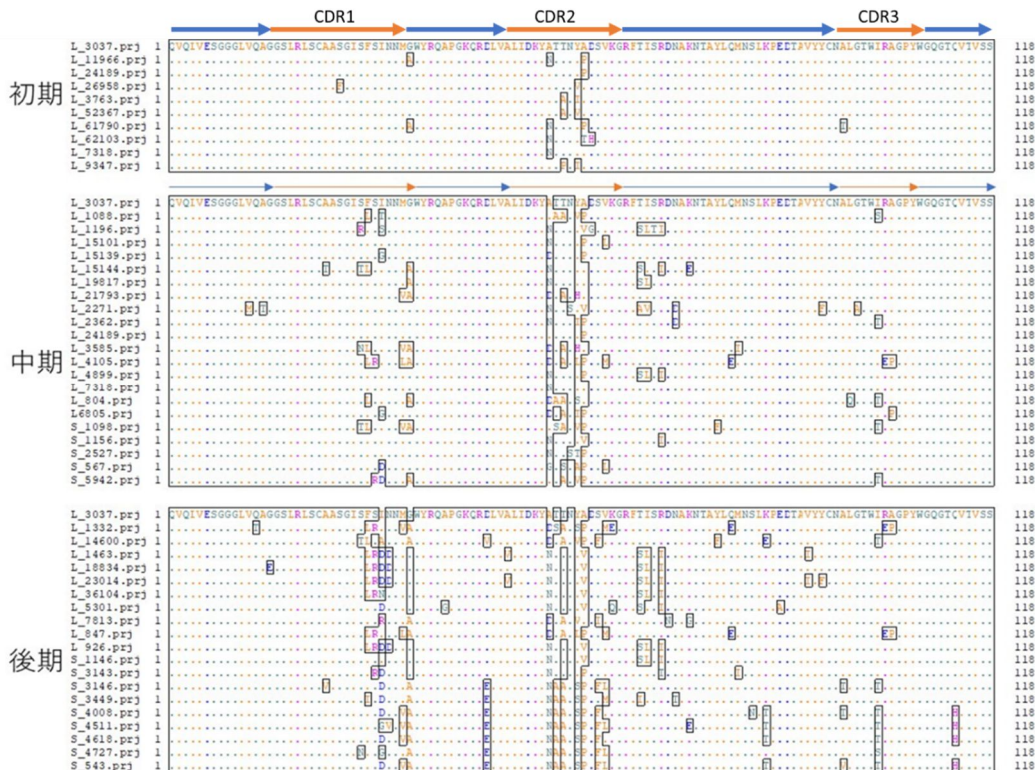


図3 作製した VHH 抗体のアミノ酸配列

(3) 免疫過程における抗原結合能と安定性への影響

各抗体の抗原への結合親和性 (K_D 値: nM) を Biacore で、熱安定性 (T_m 値:) を DFC にて解析を行い、採血週および BitScore 値との相関や、 K_D 値と T_m 値の相関について解析を行った (図 4)。変異の蓄積により結合能が上昇するの一方で熱安定性の低下が認められた。一方で、 K_D 値と T_m 値の有意な相関は認められなかった。

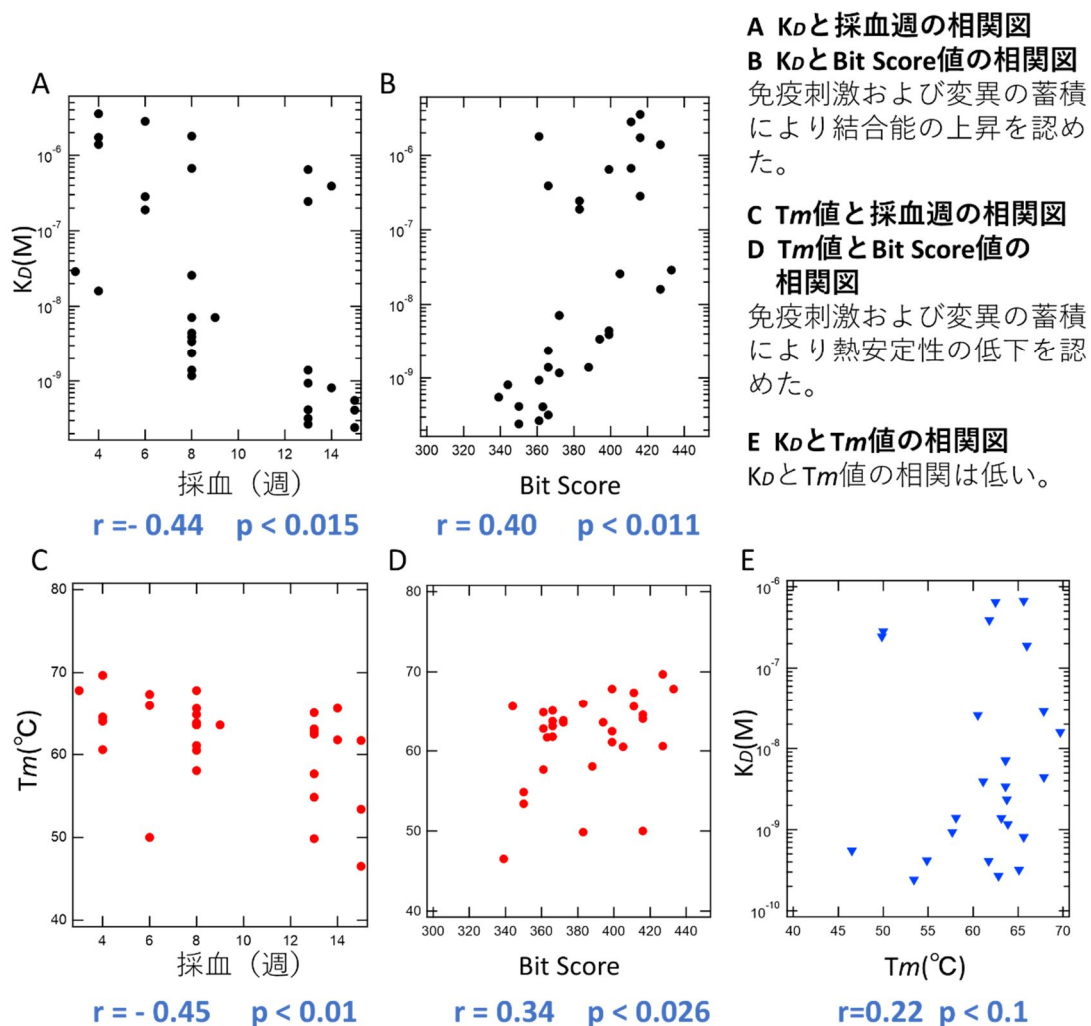


図4 免疫過程におけるKD値および T_m 値の推移

次に、酸アルカリに対する耐性について検討した。特にアルカリ耐性について、 T_m 値と同様にVHH抗体単独では免疫中期に出現したA抗体に比べ後期のC抗体は弱いことを認めた。0.1Mグリシン塩酸溶液(Gly-HCl) pH 2.2または10mM水酸化ナトリウム溶液中のCDを測定した結果、C抗体はアルカリ条件で顕著な変性を認めた。一方で、抗原-抗体複合体の場合の酸アルカリ耐性について検討した。抗原をELISAプレートに固定化後にA,BおよびC抗体と結合させ、その後に0.1M Gly-HCl pH 2.2または0.1M トリエチルアミンを室温で15分暴露した。洗浄後にプレートに残存しているVHH抗体を検出した。A抗体と比較してBおよびC抗体は酸アルカリ暴露後もプレートに残っており、抗原から解離していないと考えられる。抗原-抗体複合体となることでA抗体と比較してBおよびC抗体は酸アルカリ耐性が高くなることを認めた(図5)。

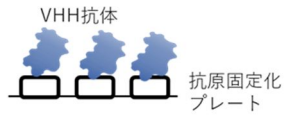
(4) まとめ

本研究より、アルパカ免疫と抗体配列進化追跡法を組み合わせることで、抗原を認識する抗体配列および物性の予測が可能である。ゲノムに保存されている抗体配列は安定性が高い一方で、成熟するにつれて抗体単独の安定性が低下する傾向があるが、抗体-抗原複合体の安定性は高くなる。さらに、結合能の強い抗体はファージディスプレイ法でスクリーニングを行った際に、プレートに残存したまま回収が出来ず、取り残しをしている可能性が示唆された。

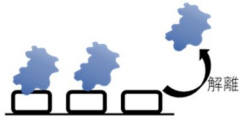
A 抗体-抗原複合体の酸・アルカリ耐性

B VHH抗体の酸・アルカリ耐性

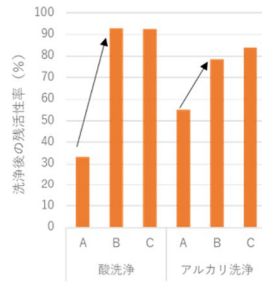
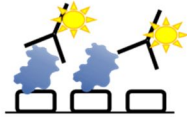
①VHH抗体と抗原を反応



②酸又はアルカリ溶液で洗浄

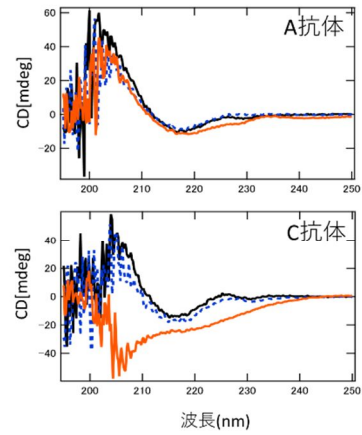


③結合しているVHH抗体を検出



A抗体：免疫中期に出現
BとC抗体：免疫後期に出現

酸：0.1M Gly-HCl pH 2.2
アルカリ：0.1M トリエチルアミン



黒実線：PBS(-)
青点線：酸条件 (0.1M Gly-HCl pH 2.2)
オレンジ実線：アルカリ条件(10mM NaOH)

図5 VHH抗体の酸アルカリ耐性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 赤澤陽子
2. 発表標題 免疫応答を利用したアルパカ由来シングルドメイン抗体の取得技術
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022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	松田 知成 (Matsuda Tomonari) (50273488)	京都大学・工学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	萩原 義久 (Hagihara Yoshihisa) (50357761)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副研究部門長 (82626)	

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
---------	---------