

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19901

研究課題名（和文）非免疫原性分子の免疫的な記憶の解明

研究課題名（英文）Elucidation of non-immunogen-related immunological memory

研究代表者

白石 貢一（Shiraishi, 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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：PEG受容体とハプテン性PEGとの繰り返し相互作用が、PEG構造に最適化されたPEG受容体として記憶され、免疫応答に影響を及ぼすという非免疫原性分子による免疫的な記憶の仮説について検証した。PEG受容体と同様の抗PEG抗体は、PEGの分子量、かつ濃度依存的に相互作用を高めると、抗PEG抗体は、通常では容易に解離される低親和性PEG(MW=12k)を保持することがGPC、およびELISAにより示唆され、脾臓夾雑環境への高濃度PEG曝露がPEG受容体構造を最適構造へと変化させていることを示唆している。PEG前投与が、免疫原性PEGの応答を高めている可能性がin vivoにおいて示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体構造は平衡状態にあり、最適な構造の際に抗原と結合するconformational selectionと、抗原と抗体が結合した後に構造変化が誘導されるInduced-fitがあるとされる。本研究は、濃厚PEG溶液という外的要因に基づく構造変化（conformational selection）とその環境下において、抗原との相互作用の結果、Induced-fitによる構造変化が誘起され、これが2回目以降の抗原曝露において、抗体の抗原認識を増強するのではないかという仮説を検証した。In vivoにおいても特異性を維持しながら、構造的な状況が変わることが示唆され、構造的免疫的記憶を実証した。

研究成果の概要（英文）：We examined a hypothesis that repeated injections of haptenic PEGs induce suitable structural changes of anti-PEG antibodies (anti-PEG Abs), in other words, anti-PEG receptors, therefore, anti-PEG receptors become more sensitive to PEGs than the naive state of anti-PEG receptors. Anti-PEG Abs specifically exhibited interactions to PEGs, and the interaction was enhanced PEG's concentration- and molecular weight-dependent manner. As a result, we observed that low affinity PEGs (MW = 12,000), which is immediately dissociated from anti-PEG Abs, was stayed on anti-PEG Abs by means of GPC and ELISA. This suggests that suitable conformational changes of anti-PEG Abs for PEGs has induced. Furthermore, we observed that high doses of PEG injection induced much sensitive anti-PEG Ab responses, which was confirmed by following immunogenic PEG injections. In sum, non-immunogenic, but haptenic PEGs possibly induce suitable conformational changes of anti-PEG Abs for PEG.

研究分野：バイオマテリアルサイエンス

キーワード：PEG 抗体 構造変化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の免疫にはパターン認識(ダメージ関連分子や病原菌関連パターン)による、速やか、かつ非特異的な自然免疫応答と、時間をかけ、より特異的、かつ持続的な免疫記憶に至る適応性獲得免疫の2つがある。獲得免疫にはT細胞依存的な応答が必要とされているが、T細胞非依存性応答の特徴は、自然免疫と獲得免疫の中間的な時間経過と応答を示す。mRNA ワクチンに使用されているポリエチレングリコール(PEG)脂質は抗PEG抗体と深く関与すると考えられている。PEG鎖は非分解性、非たんぱく質であり、PEG-脂質はT細胞非依存性の性質を示すため、免疫記憶細胞の働きはない。しかしながら、多くの健常者が抗PEG抗体を保有し、mRNA接種後の抗PEG抗体量も含めて、その健常者における抗PEG抗体は男性よりも女性の方が多い(Chen, B.M. et al. Anal. Chem. 2016)ことが知られている。こういった性差がある抗体量に関する事例は知られておらず、このことからPEG(類似)分子に曝露される機会が増え、PEGに対する感受性が上がる、即ち、PEGに対する免疫的な記憶の作用の結果ではないかと考えた。

本研究者はPEGと抗PEG抗体産生との関係について、問題の本質である、なぜPEGに抗体産生されるかについて研究を進めてきた。その中で、世界に先駆けて高分子化学の視点から検討し、PEG鎖は特異性として働くが、それ自身では抗PEG抗体、または受容体に対する十分な結合親和性がなく、PEG誘導体になることで、その結合親和性が向上し、免疫原性として働くことを見出している。事実、PEG鎖は抗PEG抗体(IgMクラスやIgGクラス)に対して、その分子間相互作用は非常に弱く、例えば分子量12,000のmPEG-OHでは 10^{-4} - 10^{-5} M程度にしかならず、実際、PEGを投与しても抗体産生は示されない。一方、結合親和性が弱いPEGであるが、濃厚溶質条件、PEGの分子量増加に伴い、抗PEG抗体への相互作用が高まることを確認している。また、非常に強い刺激をPEG誘導体と同時に作用させると、抗体産生が抑制されることを見出している。これらのことから、T細胞非依存的な免疫応答においても何らかの免疫記憶的な作用が働いているのではないかと考えられる。即ち、この考え方に基づけば、免疫的な作用に基づき、抗体産生応答が亢進される場合だけでなく、抑制される場合があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫記憶B細胞形成なしに、後天的に抗原特異的な免疫記憶作用があるのではないかについて検証することである。即ち、いかなる非免疫原性であるPEG分子の曝露においても、免疫的な記憶が残り、次のPEG分子に対する応答を準備している側面があるという仮説を追及し、明らかにする。この仮説の証明により以下の事柄が考えられる。即ち、受容体が繰り返し非免疫原性PEGの曝露や、PEG誘導体に基づく非常に強い刺激を受けることによって、PEG受容体がPEG特異性を維持したまま、より適切な構造へと変化し、その結果、速やかに結合できる状態を形成し、抗体産生が亢進する場合、もしくはその結果、応答が抑制される場合である。本挑戦的研究は、免疫的な記憶における応答の増強、及び記憶の作用を利用した抑制についての現象を解明する挑戦的、かつ萌芽的研究である。

3. 研究の方法

第一に、非免疫原性PEGを用いて、抗PEG抗体の構造変化誘導が起きるかについてin vitroにおいて検証すること、および、その結果、抗PEG抗体産生応答に変化があるかを検証することである。この点を検証するために、結合親和性の低いPEGによって、抗PEG抗体が構造変化を起こし、PEGを結合しやすくなるかを検証した。

第二に、高い免疫原性を有する PEG 誘導体の刺激に基づき、どのような抗 PEG 抗体産生応答が誘導されるかを検証することである。

4 . 研究成果

第一の結果は、結合親和性が低い PEG (分子量=12,000 や 2,000) の高濃度溶液を準備し、抗 PEG 抗体と混合した後に、GPC 測定において免疫複合体形成の検出を評価した。その結果、抗体ピークとは異なる保持時間に新たな抗体ピークが PEG とともに現れた。これは抗 PEG 抗体が PEG とともに挙動していることを示唆している。さらに、GPC 溶出液を回収し、PEG を洗浄した後、抗 PEG 抗体上の PEG を ELISA にて検出したところ、抗 PEG 抗体上に結合していると考えられる PEG が検出された。即ち、PEG 濃厚溶液を用いると、抗体が PEG をより安定した状態で結合したことを示唆している。この構造変化誘導が、抗体産生応答の亢進に働くのか、または抑制に働くのかを *in vivo* 実験において前 PEG 投与後の高免疫原性 PEG 投与により検証した。非免疫原性 PEG (分子量 12,000) の前投与を行い、続いて、高免疫原性 PEG 誘導体投与により、抗 PEG IgM 抗体産生を検証した。高投与量の非免疫原性 PEG 群において、コントロール群と比較して、抗 PEG IgM 抗体産生が高くなる傾向が得られた。高分子量 PEG を高投与量にて投与すると、PEG と PEG 受容体との相互作用が長く続くため、それに続く免疫原性 PEG-リボソームの抗体産生が抑制されることが既報にて知られている。一方、今回得られた結果は、拡散がそれ程遅くない PEG が、PEG 受容体と相互作用したことが一つの原因として考えられる。一方、非常に興味深いことに、また予想とは異なり、極低投与量の PEG 群において、コントロール群 (生食水前投与) と比較して、抗 PEG IgM 抗体産生の抑制が有意差をもって確認された。この原因については、現在明らかではない。結合親和性が低い PEG 鎖が少ない状況の方が、*in vivo* においては、受容体への作用を直接的に変えやすいのかもしれないが、これは今後の検討課題である。第二の結果は、PEG 誘導体の免疫原性をより高める手法であるが、これは PEG 誘導体に Toll-like Receptor4(TLR4)作用を示す MPLA を同時に封入すると、B 細胞上の PEG 受容体と細胞表面上の TLR4 への作用を同時に引き起こすと、繰り返しの免疫原性 PEG 誘導体に対して、抗体産生の無応答が観察され、アネジー様応答と考えられる。

非免疫原性 PEG の繰り返し暴露に基づき、PEG への感受性が高まり、免疫応答が亢進される仮説により検証を進めたが、意外なことに、むしろ逆の応答も観察された。すなわち、低親和性 PEG と抗 PEG 抗体との相互作用を適切に起こす状況は、抗体産生を抑制させる好ましい結果を生む可能性を示唆している。ただし、この結果をより詳細に検証するためには、例えば脾臓における B 細胞受容体環境に近づけ、濃厚溶質条件において検討するなどさらなる検証が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2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 Poly(ethylene glycol)の逡巡と果断
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石貢一
2. 発表標題 免疫原性のリバースエンジニアリングによる抗原性への逆変換アプローチ
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会
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	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
---------	---------