

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：85501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590578

研究課題名(和文)高シアル化IgGの調製とその抗炎症作用機序

研究課題名(英文)Preparation of sialylated IgG and elucidation of the mechanism for its anti-inflammatory properties

研究代表者

三村 雄輔(MIMURA, YUSUKE)

独立行政法人国立病院機構山口宇部医療センター(臨床研究部)・その他部局等・研究員

研究者番号：00219718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：IgG抗体のFc部位アスパラギン297に結合した糖鎖は抗体のエフェクター機能発現に必須である。近年糖鎖の末端にシアル酸を持つIgGは抗炎症作用を媒介すると示されている。我々はIgG1のPhe243Ala変異体をヒトおよびげっ歯類細胞株にて産生し、シアル化が著明に増強されることを明らかにした。その抗体を用いてIgG-Fc糖鎖末端のシアル酸が、DC-SIGN発現樹状細胞に対してどのように作用して抗炎症作用を発揮するか調べた。

研究成果の概要(英文)：The attachment of oligosaccharide, at Asn297, of the IgG-Fc heavy chain is essential for optimal activation of Fc effector functions. It has recently been shown that IgG with oligosaccharides bearing terminal sialic acid residues mediates anti-inflammatory therapeutic effects. We expressed an IgG1 Phe243Ala (F243A) mutant in both human and rodent cell lines, and sialylation was found to be markedly increased. The mechanism by which the sialic acid residues in the IgG-Fc oligosaccharides exert an anti-inflammatory effect has been investigated by using dendritic cells that express DC-SIGN.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：IgG glycosylation sialylation DC-SIGN

1. 研究開始当初の背景

免疫グロブリン静注療法 (intravenous immunoglobulin: IVIG) は、特発性血小板減少症、川崎病、ギランバレー症候群などの自己免疫疾患に対して有効な治療法として行われる。IVIG 製剤はヒト血清由来ポリクローナル IgG 抗体から成り、その抗炎症作用機序は未だ完全には解明されていない。近年シアル化糖鎖を持つ IgG が IVIG の抗炎症効果を示すと報告されているが (Anthony, RM, et al., Nature 475, 2011)、シアル化の程度と抗炎症効果との間の定量的な検証や作用機序解明が必要である。IVIG 療法は高価であるうえに供給に限りがあり代替薬剤の開発が望まれるが、シアル化 IgG 抗体の作製は未だ技術的に困難である。

2. 研究の目的

(1) ヒト型シアル化 IgG 抗体作製の為の宿主細胞選択や培養条件の至適化を行い、シアル酸付加による IgG-Fc エフェクター機能への影響を調べる。

(2) シアル化 IgG が免疫細胞上の DC-SIGN に結合するか調べるとともに、抗炎症作用をもたらす液性因子が何であるか、DC-SIGN 結合後に発現増加するサイトカインを網羅的に調べる。

3. 研究の方法

本研究では $\alpha 2 \rightarrow 6$ シアル化 IgG を作製し、シアル酸残基付加による IgG-Fc のエフェクター機能への影響や抗炎症作用の分子機序を解明する。シアル化 IgG の受容体として推測されている DC-SIGN をヒト単球細胞株で強制発現させ、両者の相互作用や産生誘導されるサイトカイン類を分析するとともに、ヒト B 細胞株やマクロファージを用いて抗炎症作用を持つか調べる。

(1) シアル化 IgG 調製の培養条件の至適化と糖鎖分析

IVIG の抗炎症作用の主成分と推定されているシアル化 IgG を F243A 変異体として調製、ヒト細胞での発現、精製、糖鎖構造解析を行う。シアル化レベルを増強するためのシアル酸前駆体 ManNAc、シアル酸転移酵素の補酵素 Mn イオンなどの添加材を加え、培養条件の至適化を行う。シアル化レベルを様々な培養条件で比較し、最もシアル化糖鎖が得られ

る条件を採用する。

(2) シアル化 IgG の ADCC 活性の解析
シアル化 IgG の ADCC (抗体依存性細胞障害) を脱シアル化 IgG と比較し、シアル酸付加による影響を調べる。ADCC は培養細胞をハプテンである NIP (5-iodo-4-hydroxy-3-nitrophenyl) 基で修飾し、シアル化 IgG を様々な濃度で感作した後、NK 細胞を含む末梢血単核球と反応させ、溶解した細胞から遊離された乳酸脱水素酵素を定量する。

(3) シアル化 IgG と DC-SIGN との相互作用の解析

シアル化 IgG 受容体と推測されている DC-SIGN をヒト単球細胞株 (U937)、B リンパ腫細胞株に強制発現させる。DC-SIGN 遺伝子発現が効率よく進まない場合、代わりにヒト末梢血単球を利用し、GM-CSF と IL-4 存在下で培養する事により樹状細胞へと分化誘導する。分化前の CD14 陽性単球と分化後 DC-SIGN 陽性樹状細胞を用いて、シアル化 IgG に応答するかをサイトカイン測定等により調べる。DC-SIGN 陽性および陰性細胞をシアル化 IgG の存在下と非存在下で培養し、上清を Bio-Plex Pro ヒトサイトカインアッセイシステムを用いて炎症性、抗炎症性サイトカインの発現の変化を網羅的に調べる。

4. 研究結果

(1) シアル化 IgG の哺乳類細胞株での発現
IgG1 野生型と F243A 変異体遺伝子のベクターを図 1 のように構築し、マウス J558L 細胞、HEK293 細胞、CHO-K1 細胞にて発現させた。

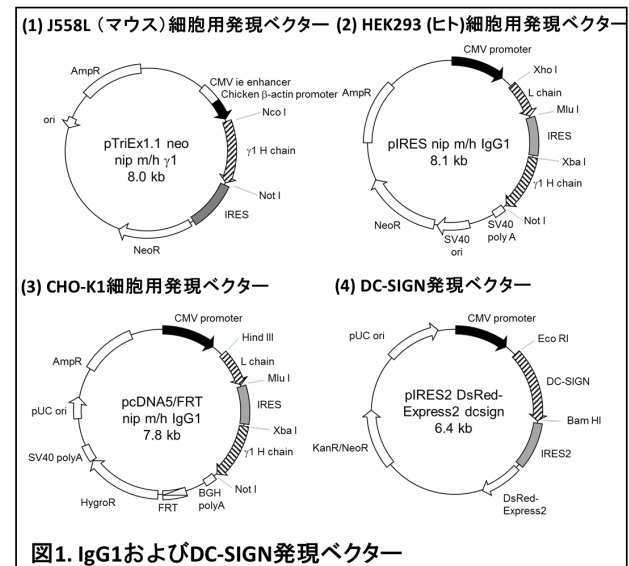


図1. IgG1およびDC-SIGN発現ベクター

抗体をプロテイン G で精製し、SDS 電気泳動で分析したところ、均一な H 鎖と L 鎖に分離された (図 2)。

細胞培養には無血清培地と血清培地の両方を用いた。無血清培地は、マウス J558L 細胞には Hybridoma-SFM、CHO 細胞には CHO-S-SFM II および CD OptiCHO、HEK293

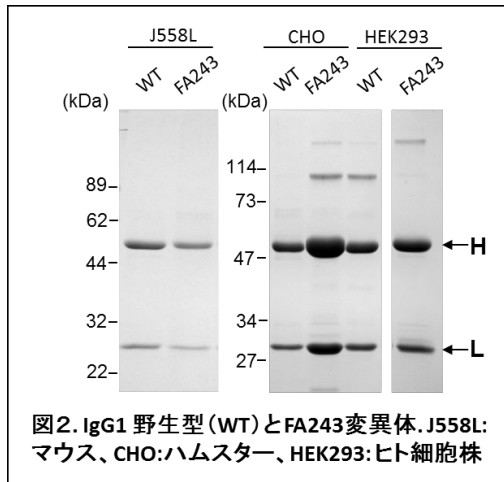


図2. IgG1 野生型(WT)とFA243変異体. J558L: マウス, CHO:ハムスター、HEK293:ヒト細胞株

細胞には 293SFM II および CD293(全て Life Technologies) を使用した。しかし、Hybridoma-SFM 以外は抗体の生産性が低く、糖鎖解析や機能解析は困難であったため、次にバイオリアクター (INTEGRA CELLLine AD-1000 Adhere、Integra Bioscience) に、2 % Ultra Low IgG ウシ胎児血清を用いて産生した。その他の方法として、10% ウシ胎児血清を含む RPMI や DMEM 培地を用いて上清を集め、NIP ハプテン特異性を利用した NIP 結合 Sepharose カラムに結合させた後、NIP-e-Aminocaproic Acid で溶出し、その溶離液中 IgG を更に protein G Sepharose カラムで精製した。後者の方法が最も抗体の収率が高く、純度も良好であった。

(2) 糖鎖解析

IgG1 の Fc 部位結合糖鎖は SDS 電気泳動ゲルの H 鎖バンドをゲル内で Peptide-N-Glycosidase F 消化、2-aminobenzamide 標識し、順相 HPLC で分析した。F243A 変異体は予想通りに野生型に比べ、ガラクトシル化、シアル化レベルが共に高かった (図 3)。シアル化レベル増強を目的として ManNAc や MnCl₂ 等の添加物を培地に加えて産生した IgG の糖鎖解析を行い、興味深い結果が得られた (現在再試験中)。

シアル化 IgG の生理活性を調べる為に、In

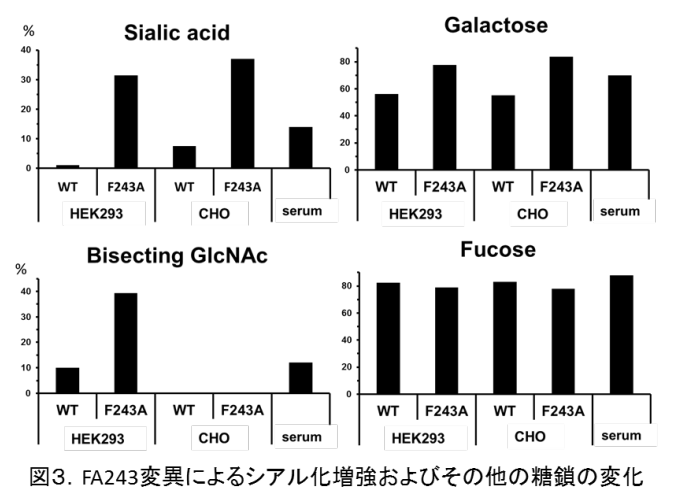


図3. FA243変異によるシアル化増強およびその他の糖鎖の変化

vitro で酵素的にシアル化 IgG 産生を試みた。 $\alpha 2 \rightarrow 3$ sialyltransferases を *Pasteurella multocida* 由来 (Sigma) および *Photobacterium sp. JT-ISH-224* 由来 (Cosmo Bio) と $\alpha 2 \rightarrow 6$ -sialyltransferases を *Photobacterium damsela* 由来 (Sigma) および *Photobacterium damsela* JT0160 (Cosmo Bio)由来を用いたところ、すべての酵素にシアリダーゼ活性が検出され、脱シアル化 IgG のみが産生されたため、この方法は断念した。一方、レクチンを用いてシアル化 IgG を濃縮する方法が報告されており (Anthony, RM, et al., Science 320, 2008)、*Sambucus Nigra* (Elderberry) Bark レクチン結合アガロースを用いて、F243A 変異体のシアル化グリコフォームの単離を試みた。しかし、シアル化 IgG のほとんどはカラムを素通りしたため、濃縮はできなかった。最近、この方法で濃縮される IgG は Fab 結合シアル化糖鎖をもつ IgG であるとの報告があり (Kasermann, F, et al., ProsOne 7, 2012)、この方法論の妥当性には問題があると思われる。

(3) シアル化 IgG の ADCC 活性

CHO 細胞を NIP-e-Aminocaproyl-OSu で標識し標的細胞(T)として用い、末梢血単核球をエフェクター細胞(E)として用いた。E/T 比を 25 として、様々な濃度の IgG で標的細胞を感作し、50% cytotoxicity が検出される抗体濃度を野生型と F243A 変異体とで比較した。cytotoxicity は抗体濃度 1 ng/ml - 0.3 ug/ml の範囲で検出された。F243A 変異体の ADCC 活性は野生型より 10 倍程度低かった。シアル酸残基の付加の影響を調べるために脱シアル化 F243A 変異体の ADCC 活性とも比較した。CHO 由来 F243A 変異体と HEK293 由来 F243A 変異体ではシアル酸残基の結合様式が

異なるため、両者で異なる結果が得られた
(現在再試験中)

(4) シアル化 IgG の樹状細胞への作用

DC-SIGN がシアル化 IgG の受容体と推測されているため、DC-SIGN 発現ベクターを図1のように構築し、U937 単球細胞株に遺伝子導入した。DC-SIGN 発現細胞は赤色蛍光を発する(図4)。しかし、遺伝子導入 U937 細胞は直ちに細胞死に至り、使用できなかった。代わりに末梢血単核球から CD14 陽性単球を単離し IL-4 と GM-CSF 存在下で樹状細胞(DC)へ分化誘導した細胞を用いた(Mo-DC Generation Toolbox, Miltenyi Biotec)(図5)。シアル化 IgG または脱シアル化 IgG を結合した抗原と DC を培養し、どのような液性因子が DC から産生されるか現在解析中である。

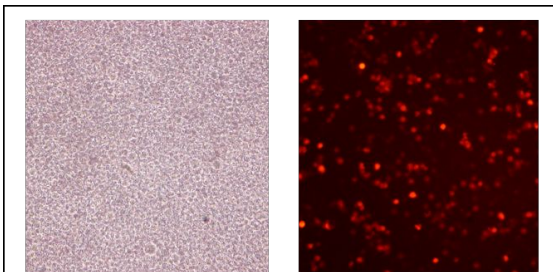


図4. DC-SIGN遺伝子導入U937細胞. pIRES2 DsRed-Express2 dsign (図1-4)をElectroporation (1400 V, 20 ms, 2 pulses)でU937細胞へ導入。赤色蛍光を示す細胞がDC-SIGNを発現している。2日後から細胞死が始まった。

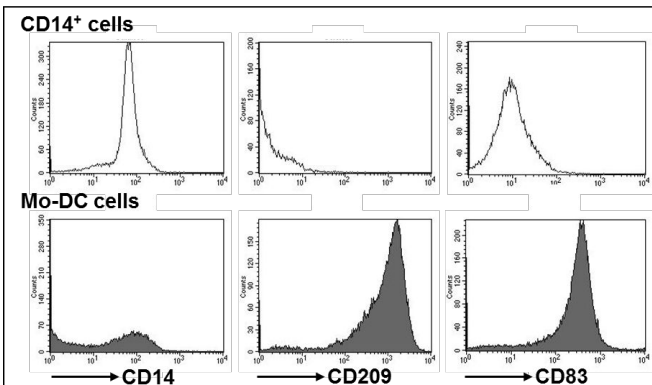


図5.単球由来樹状細胞 (Mo-DC)の調製. 末梢血単核球から CD14+細胞を単離し、Mo-DC Differentiation MediumとMo-DC Maturation Mediumで樹状細胞へ分化誘導した。分化が進むとCD14が陰性化し、CD209 (DC-SIGN)およびCD83が陽性化した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計2件)

平成25年度

1. Mimura, Y., et al., Increased sialylation of a recombinant IgG mutant produced in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells, 15th International Congress of Immunology, Milan Aug 22-27, 2013
2. Mimura, Y., et al., Enhanced sialylation of a mouse-human chimeric IgG1 antibody produced in human embryonic kidney 293 (HEK293) cells, 第42回日本免疫学会学術集会、千葉、平成25年12月11-13日

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

三村雄輔 (Yusuke Mimura)

山口宇部医療センター臨床研究部

臨床研究部長

研究者番号: 00219718